

# Algas, helechos y plantas vasculares acuáticas en estudios de contaminación ambiental y ecotoxicología



La impresión de este libro ha sido financiada con el aporte del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT). Proyectos PICT 2013-1348 y PICT 2014-1460.

# **Algas, helechos y plantas vasculares acuáticas en estudios de contaminación ambiental y ecotoxicología**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
*de* MAR DEL PLATA  
.....

ISBN: 978-987-544-756-1

Algas, helechos y plantas vasculares acuáticas en estudios de contaminación ambiental y ecotoxicología / Débora Jesabel Perez ... [et al.]; compilado por Débora Jesabel Perez; Mirta Luján Menone. - 1a ed. - Mar del Plata: Universidad Nacional de Mar del Plata, 2017.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-544-756-1

1. Contaminación Ambiental. 2. Medio Ambiente. 3. Plantas Acuáticas. I. Perez, Débora Jesabel II. Perez, Débora Jesabel, comp. III. Menone, Mirta Luján, comp.

CDD 577.6

Fotos de cubierta: Débora Jesabel Pérez, Mirta Luján Menone

Primera Edición: Mayo de 2017

# **Algas, helechos y plantas vasculares acuáticas en estudios de contaminación ambiental y ecotoxicología**

## **Compiladores**

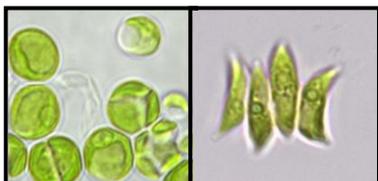
Dra. Pérez, Débora Jesabel

Dra. Menone, Mirta Luján

# ÍNDICE

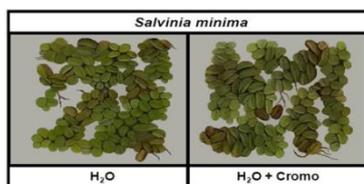
**Presentación** ..... 7

**Capítulo 1** ..... 9



Microalgas como modelo biológico en estudios de contaminación ambiental: Efecto de herbicidas y antibióticos sobre la fisiología, morfología, ultraestructura y parámetros de estrés oxidativo.

**Capítulo 2** ..... 32



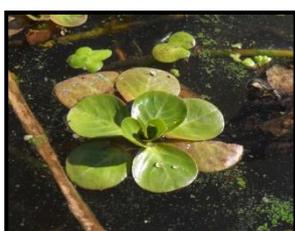
Aspectos bioquímicos y fisiológicos de la tolerancia al cromo por *Salvinia minima*.

**Capítulo 3** ..... 54



Efecto de contaminantes sobre las macrófitas acuáticas: aplicaciones en la fitorremediación.

**Capítulo 4** ..... 84



Utilización de la hidrófita *Ludwigia peploides* para biomonitoreo del herbicida glifosato en ecosistemas acuáticos. Estudio en una cuenca del sudeste bonaerense.

# Presentación

---

Debido al uso masivo de organismos animales en sistemas de experimentación con este libro pretendemos dar a conocer el estado del arte acerca del uso de organismos vegetales que habitan ecosistemas acuáticos, en estudios de contaminación ambiental y ecotoxicología en nuestro país. Así, en este libro se presentan resultados de grupos de investigación abocados a la utilización de especies de algas, helechos acuáticos y plantas vasculares acuáticas. Los contenidos fueron presentados en el Simposio “Algas, líquenes, helechos y plantas vasculares en estudios de contaminación ambiental y ecotoxicología” llevado a cabo en el VI Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC -*Society of Environmental Toxicology and Chemistry*-), Capítulo Argentino, celebrado en la ciudad de Córdoba del 11 al 14 de Octubre de 2016.

En el primer capítulo la Dra. Ángela Beatriz Juárez presenta resultados de la exposición a contaminantes de diferente naturaleza (herbicidas y antibióticos) sobre marcadores morfológicos, ultraestructurales y bioquímicos (particularmente de estrés oxidativo) en poblaciones y comunidades de microalgas. En el segundo capítulo, el Dr. Fernando Eduardo Prado relata efectos fisiológicos y bioquímicos del cromo sobre helechos acuáticos, ciertamente un grupo biológico poco estudiado. El tercer capítulo, a cargo de la Dra. María de las Mercedes Mufarrege, trata también la contaminación por metales (cromo, níquel, zinc) en plantas vasculares acuáticas y especialmente detalla efectos a nivel morfológico y fisiológico y la influencia de condiciones ambientales tales como condiciones extremas de pH y/o salinidad. Finalmente, en el cuarto capítulo, la Dra. Débora Jesabel Pérez propone el uso de la hidrófita *Ludwigia peploides* para el biomonitoreo del glifosato en una cuenca del sudeste bonaerense, incluyendo la puesta a punto de una metodología de detección del herbicida y su principal metabolito ácido metil-fosfónico (AMPA) en dicha especie.

Los estudios que se detallan aquí demuestran la capacidad de estos organismos para acumular en sus tejidos contaminantes de naturaleza diversa,

así como su sensibilidad, reaccionando a distintos niveles de organización (organismo, población y comunidad). Este libro no aborda todos los temas investigados en el país, pero brinda un panorama general e intenta contribuir a despertar interés por los estudios de química ambiental y ecotoxicología utilizando organismos vegetales como modelos.

Dra. MIRTHA LUJÁN MENONE

Investigadora Independiente del CONICET y Docente de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Laboratorio de Ecotoxicología. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (IIMYC) CONICET/ UNMDP  
Mar del Plata, Argentina.

# Microalgas como modelo biológico en estudios de contaminación ambiental: Efecto de herbicidas y antibióticos sobre la fisiología, morfología, ultraestructura y parámetros de estrés oxidativo

---

**Ángela Beatriz Juárez**

## RESUMEN

Las algas constituyen un grupo polifilético enormemente diverso de organismos fotosintéticos oxigénicos. Están presentes en prácticamente todos los ecosistemas de la biósfera y su importancia ecológica es enorme. Debido a su papel fundamental en el sostenimiento de las tramas tróficas, las algas (particularmente las microalgas) son importantes modelos para el estudio de toxicidad de contaminantes acuáticos. Actividades como la agricultura y la ganadería determinan el ingreso de contaminantes, como herbicidas y antibióticos de uso veterinario, a los cuerpos de agua, poniendo en riesgo la integridad de sus comunidades y la conservación de ecosistemas importantes para el equilibrio del ambiente. Actualmente existe un consenso en que la evaluación del efecto de contaminantes ambientales debe incluir el biomonitoreo a distintos niveles de organización (ecosistema, comunidad, población, individuo, celular y subcelular). En esa línea, la inclusión del análisis de marcadores morfológicos, ultraestructurales y bioquímicos (particularmente de estrés oxidativo) de poblaciones y/o comunidades de microalgas puede constituir una alerta temprana del riesgo al que está expuesto el ecosistema. La evaluación de estos parámetros no sólo puede dar información de los mecanismos de toxicidad de los contaminantes sino también del impacto que tienen sobre las microalgas y las tramas tróficas que ellas sostienen.

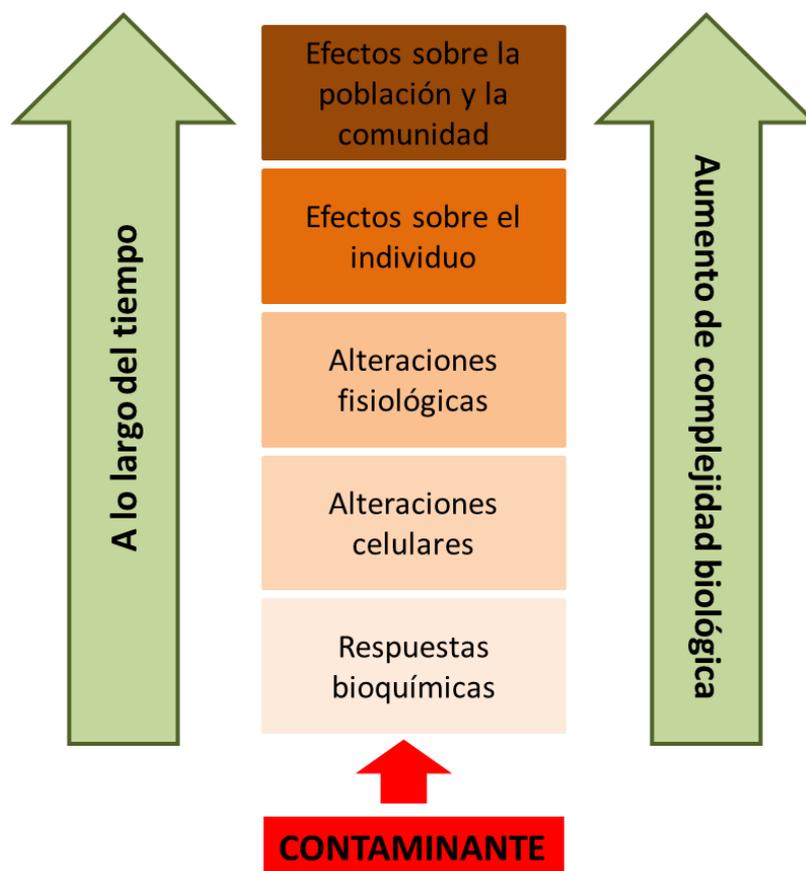
**Palabras claves:** microalgas, contaminación, estrés oxidativo, ultraestructura, herbicidas, antibióticos

## Introducción

En la actualidad, tanto la comunidad científica como la sociedad en general han tomado conciencia de los problemas de contaminación que afectan a distintos ambientes del planeta. Entre ellos, la contaminación del ambiente acuático es uno de los problemas especialmente relevantes debido a la importancia del agua como recurso para el hombre y para el sostenimiento de la vida en el planeta. Distintas actividades y distintos factores son los que contribuyen a este problema. El desarrollo y la expansión urbana, las actividades industriales, la agricultura, la ganadería, etc., llevan al vertido de efluentes y aguas residuales, o a la llegada de contaminantes por escorrentía, en los cuerpos de agua. En muchos casos, el incumplimiento de las leyes regulatorias sobre el vertido de residuos, sumado al escaso control y a años de considerar que el agua posee un gran poder de dilución y biodegradación, han llevado a que muchos cuerpos de agua contengan mezclas de contaminantes, llegando incluso a encontrarse altas concentraciones de ellos. El ingreso de nutrientes o xenobióticos puede producir una estimulación o una inhibición del crecimiento de los organismos y, de esa manera, provocar cambios en el ecosistema. Cuando un contaminante ingresa en un cuerpo de agua, primero afecta a los organismos a nivel bioquímico y se extiende a lo largo de distintos niveles o escalas (Figura 1). El primer impacto sobre los procesos bioquímicos de los organismos lleva a alteraciones fisiológicas, alteraciones celulares, alteraciones a escala individuo y finalmente a alteraciones a escala poblacional y de comunidades, lo cual determina un cambio en la estructura y dinámica del ecosistema.

Las microalgas conforman la comunidad productora de los ecosistemas acuáticos y son las primeras en responder a cualquier alteración de su ambiente, incluyendo el ingreso de xenobióticos. Tienen la capacidad de absorber los contaminantes y biotransformar compuestos orgánicos e inmovilizar los elementos inorgánicos disminuyendo su disponibilidad y toxicidad para el resto de la biota acuática (Semple *et al.*, 1999; Murray *et al.*, 2003; Perales-Vela *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2008). Pero además, por ser la base de las cadenas tróficas, están implicadas en el ingreso de los

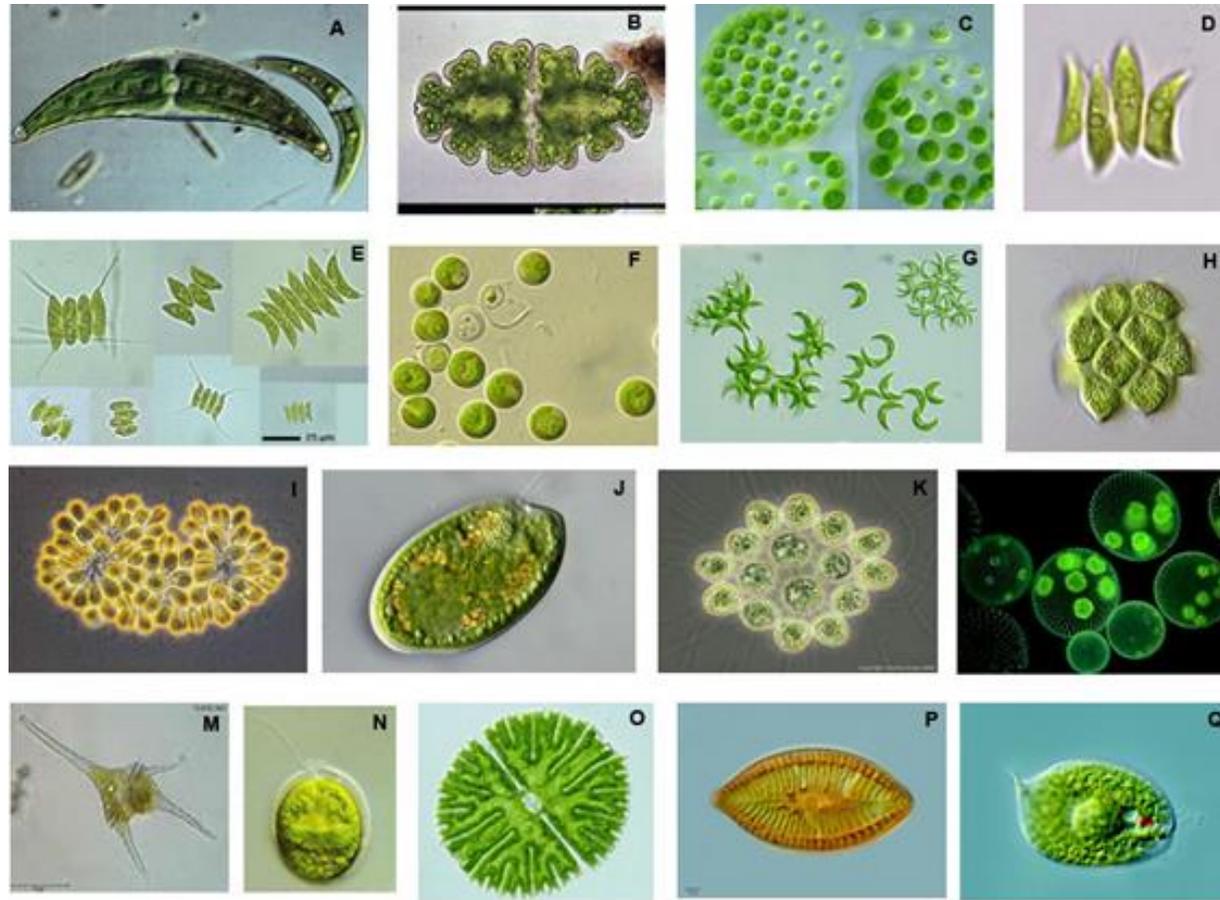
contaminantes y en la ocurrencia de bioconcentración y biomagnificación de estos compuestos en las tramas tróficas (Torres *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta esto, hoy en día existe un consenso sobre la forma de abordar la evaluación del impacto de la contaminación, entendiendo que deben incluirse biomonitoreos a distintas escalas y en distintos niveles tróficos. La evaluación de lo que ocurre a nivel comunidad y población, más el análisis de biomarcadores bioquímicos, fisiológicos y morfológicos en niveles tróficos claves, permite caracterizar la respuesta biótica y tener un panorama del estado de riesgo en el que se encuentra un ecosistema acuático.



**Figura 1:** Impacto de un contaminante a distintas escalas de un ecosistema. Modificado de Mussali-Galante *et al.* (2013).

## Las microalgas como modelo biológico

Las algas constituyen un grupo polifilético enormemente diverso de organismos fotosintéticos oxigénicos (Figura 2). Están presentes en prácticamente todos los ecosistemas de la biósfera y su importancia ecológica es enorme. Constituyendo sólo el 1% de la biomasa fotosintetizadora son responsables de la liberación del 60% del oxígeno respirable y del 50% del total de la fotosíntesis del planeta y forman la base de cadenas tróficas que sustentan alrededor del 70% de la biomasa mundial (Chapman, 2013). Debido a este papel fundamental y a la posibilidad de aislarlas y cultivarlas en laboratorio, las microalgas son importantes modelos biológicos para el estudio de toxicidad de contaminantes acuáticos. Las microalgas constituyen el fitoplancton, el cual corresponde a la comunidad productora clave en un cuerpo de agua, ya que sostiene los niveles tróficos superiores. Además de ese papel fundamental, las microalgas presentan una serie de características que determinan su importancia como modelo biológico en estudios de contaminación: son sensibles a la mayoría de los tóxicos y, en general, más sensibles que los organismos de niveles tróficos superiores, son fáciles de manejar en cultivos de laboratorio, tienen un tiempo generacional corto y presentan rápidas respuestas fisiológicas, lo que permite evaluar los efectos de los contaminantes en plazos cortos.



**Figura 2.** Diversidad de microalgas. *Closterium* spp. (A), *Euastrum* spp. (B), *Pleodorina* spp. (C), *Scenedesmus acutus* (D), *Scenedesmus* spp (E), *Chlorella* spp. (F), *Selenastrum* spp (G), *Pyrobotrys* spp. (H), *Synura* spp. (I), *Cryptomonas* spp. (J), *Gonium* spp. (K), *Volvox* spp. (L), *Ceratium* spp. (M), *Chlamydomonas* spp. (N), *Micrasterias* spp. (O), *Surirella* spp. (P), *Phacus* spp (Q). Tomado de O'Kelly y Littlejohn (1994-2004).

Sobre la base de esas características, las microalgas son utilizadas para evaluar el efecto de contaminantes, efluentes y sustancias tóxicas y existen protocolos y directivas de organismos nacionales e internacionales que regulan y especifican el desarrollo de bioensayos algales para ese tipo de evaluaciones, como *United States Environmental Protection Agency* (USEPA), *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD), *Environment Canada* y el Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM, Norma 29111). En estas directivas, las principales especies de microalgas de agua dulce establecidas como estándares internacionales son *Pseudokirchneriella subcapitata* (antes *Selenastrum capricornutum* y *Raphidocelis subcapitata*), *Scenedesmus subspicatus* y *Chlorella vulgaris*.

Los estudios con microalgas, no sólo permiten analizar los efectos de la contaminación a nivel comunidad en aproximaciones a campo (por ejemplo, evaluando cambios en la densidad y composición de especies), sino que permiten analizar los efectos sobre una población. Mediante el desarrollo de bioensayos se puede evaluar la sensibilidad y tolerancia de distintas especies a diferentes contaminantes y los efectos que éstos tienen sobre parámetros morfológicos, ultraestructurales, fisiológicos y bioquímicos (incluyendo parámetros indicadores de estrés oxidativo).

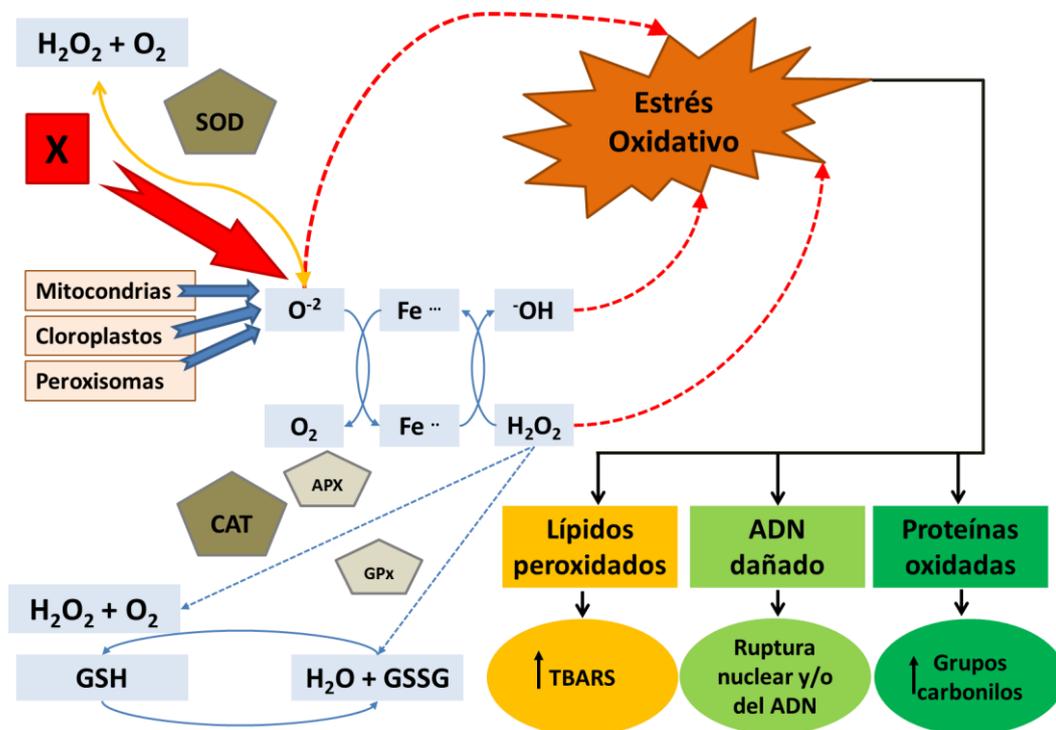
## **Estrés oxidativo y contaminantes**

Los principales procesos fisiológicos celulares generan especies reactivas de oxígeno (EROS). En las células fotosintéticas (como es el caso de las microalgas), las principales organelas generadoras de EROS son las mitocondrias, los cloroplastos y, en menor medida, los peroxisomas, donde se forman como consecuencia del metabolismo energético oxidativo y el intenso flujo de electrones que existe en las membranas mitocondriales y tilacoidales (Asada, 1999; Kowaltowski *et al.*, 2009). Además, diversos factores ambientales y el ingreso de contaminantes en las células pueden exacerbar la producción de esas moléculas, siendo las más dañinas el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) (Pinto *et al.*

2003; Valavanidis *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2008). Las EROS son altamente reactivas y pueden oxidar macromoléculas esenciales, por lo que todas las células cuentan con un sistema de defensas antioxidantes que neutraliza o metaboliza las EROS. Este sistema incluye enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, glutatión peroxidasa, etc.) y metabolitos de bajo peso molecular (glutatión, ácido ascórbico, carotenos, fenoles, flavonoides, etc.). Si este sistema de defensas es superado, el equilibrio de oxido-reducción celular se desplaza a una situación pro-oxidante y se llega a un estado de estrés oxidativo en el cual ocurre daño oxidativo a proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Ríos de Molina, 2003) (Figura 3). Ese daño a nivel molecular provoca alteraciones en la fisiología y en la integridad de las estructuras celulares, conduciendo a la muerte celular, lo cual también tendrá consecuencias en la población y en la comunidad.

La evaluación de parámetros relacionados a estrés oxidativo, como los niveles de EROS, daño a macromoléculas y respuesta antioxidante, no sólo puede dar información de los mecanismos de toxicidad de los contaminantes sino también del impacto que ellos tienen sobre las algas y las tramas tróficas que ellas sostienen. Entre las defensas antioxidantes normalmente evaluadas en microalgas se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y ascorbato peroxidasa (APX) y los antioxidantes no enzimáticos como glutatión (GSH), ácido ascórbico, carotenos y fenoles. La evaluación de daño oxidativo comúnmente involucra el análisis de niveles de peroxidación lipídica (a través de la medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico -TBARS-), oxidación de proteínas (a través de la medición de grupos carbonilos) y daño al ADN (por ejemplo evaluando ruptura nuclear y niveles de bases oxidadas) (Figura 3). Un aspecto importante es que las alteraciones en estos parámetros pueden detectarse antes de observar daños a escalas biológicas superiores (célula, individuo, población, comunidad), por lo que pueden proveer alertas tempranas del efecto de un contaminante sobre la biota (Cajaraville *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2004; Sarkar *et al.*, 2006).

Las microalgas pueden, entonces, ser modelos muy útiles para obtener una visión integrada de la respuesta del ecosistema acuático al ingreso de un contaminante y también permiten monitorear efectos tóxicos sobre su fisiología (Pinto *et al.*, 2003; Geoffroy *et al.*, 2002 y 2003; Mallick, 2004). La mayoría de los trabajos que evalúan la toxicidad de contaminantes en microalgas investigan los efectos a nivel de crecimiento, contenido de pigmentos y fotosíntesis (Wong, 2000; Tsui y Chu, 2003; Juárez *et al.*, 2008; Vendrell *et al.*, 2009; Lipok *et al.*, 2010; Magdaleno *et al.*, 2015 a y b). Sin embargo, numerosas investigaciones también han reportado alteraciones a nivel bioquímico, relacionadas con marcadores de estrés oxidativo, en microalgas expuestas a metales pesados, antibióticos, herbicidas y otros contaminantes (Pinto *et al.*, 2003; Lei *et al.*, 2006; Sabatini *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2011).



**Figura 3:** Daño oxidativo provocado por la exposición a un contaminante. X: contaminante; SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; APX: ascorbato peroxidasa; GPx: glutatión peroxidasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; TBARS: especies reactivas al ácido tiobarbitúrico. Modificado de Romero (2008).

## Evaluación del efecto de herbicidas y antibióticos en microalgas

A continuación se describen algunos de los resultados que hemos obtenido en nuestro grupo de investigación, llevando adelante estudios de los efectos de contaminantes urbanos y agrícola-ganaderos sobre microalgas autóctonas y no autóctonas y que incluyen la evaluación de la participación de procesos de estrés oxidativo.

La provincia de Buenos Aires presenta una particular problemática de contaminación. Tiene una vasta superficie cultivada, con casi el 53% del área sembrada correspondiendo a soja (Ministerio de Economía, 2016). La actividad agrícola constituye una de las principales fuentes de contaminación difusa, por liberar al ambiente una elevada cantidad de herbicidas y otros plaguicidas que llegan a las aguas superficiales por medio de escorrentías y deriva aérea. El glifosato es uno de los herbicidas más ampliamente aplicado en las zonas rurales de esta provincia y algunas de las formulaciones más utilizadas corresponden a Roundup® y Atanor®. Además, en los últimos años, debido al surgimiento de malezas resistentes, se están aplicando otro tipo de herbicidas como el imazetapir (perteneciente al grupo de las imidazolinonas). Por otra parte la actividad ganadera genera, principalmente, un ingreso de materia orgánica y fármacos de uso veterinario al ambiente (Matthiessen *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010). En particular, la cría intensiva de ganado en “feedlots” implica el uso de una variedad de fármacos que, luego de ser aplicados a los animales, son eliminados al ambiente a través de sus excretas. Esta actividad constituye una de las principales fuentes de contaminación puntual en aguas superficiales de agroecosistemas. Entre los fármacos que se aplican generalizadamente al ganado bovino se encuentran los antibióticos oxitetraciclina, clortetraciclina y enrofloxacin, entre otros.

Grandes extensiones de los cursos de agua de la provincia de Buenos Aires atraviesan zonas urbanas donde, entre otras cosas, tienen contacto con el ingreso de aguas residuales domiciliarias y hospitalarias. Entre los contaminantes que ingresan desde este tipo de efluentes, los antibióticos representan una fracción importante y son los que probablemente generan mayor preocupación e interés de estudio en los últimos años. Por ejemplo, en

los hospitales de Buenos Aires los antibióticos más usados son ampicilina, amoxicilina, ciprofloxacina, gentamicina y vancomicina, entre otros (Magdaleno *et al.*, 2015 b).

Las distintas especies de microalgas presentan distinta sensibilidad a los tóxicos, por lo que los contaminantes pueden afectar diferencialmente el crecimiento y supervivencia de las especies presentes en un cuerpo de agua de una determinada región. El análisis del efecto de distintos contaminantes sobre una especie de colección internacional (como las indicadas en los protocolos de ensayos internacionales) o de otra región, no necesariamente informará sobre el impacto en las especies de nuestro país. Por lo que abordar un análisis del efecto sobre distintas microalgas aisladas específicamente de cuerpos de agua de Argentina, puede aportar información local y llevar al establecimiento de especies “centinela” que permitan alertar sobre el riesgo al que estarían expuestos los cuerpos de agua de nuestra región.

En este contexto, hemos evaluado el efecto de contaminantes urbanos y agrícolas en especies autóctonas y no autóctonas. Se realizaron estudios con dos microalgas de colecciones internacionales (*Scenedesmus vacuolatus* y *Pseudokirchneriella subcapitata*) y con especies autóctonas como *Parachlorella kessleri*, aislada de un área termal de Neuquén, y tres especies aisladas del río Matanza (*Ankistrodesmus fusiformis*, *Scenedesmus acutus* y *Monoraphidium contortum*). Se desarrollaron bioensayos de exposición a antibióticos (clortetraciclina, gentamicina y vancomicina) y a formulaciones y principios activos de herbicidas (Glifosato Atanor® – 48% sal de isopromilamina de glifosato -, formulación Glifosato II Atanor® – 43,8% sal monopotásica de glifosato -, formulación Verosil® - sal de amonio de imazetapir -). Se evaluó la toxicidad de esos contaminantes (incluyendo análisis del crecimiento y determinación de concentraciones inhibitorias) y la morfología, ultraestructura y parámetros de estrés oxidativo en las algas expuestas a distintas concentraciones de esos contaminantes.

Mediante la evaluación del crecimiento y determinación de las concentraciones inhibitorias 50 (CI50), se obtuvo información relevante relacionada con la toxicidad de herbicidas y antibióticos y con la sensibilidad de

las microalgas autóctonas y no autóctonas (Tabla 1). Los resultados evidenciaron la diferente sensibilidad de las especies y la diferente toxicidad de los antibióticos y de las distintas formulaciones de herbicidas y principios activos. El anexo IV de la Directiva 67/548/EEC de la Comunidad Europea que clasifica la peligrosidad de las sustancias para el ambiente acuático (Carlsson *et al.*, 2006) establece las siguientes categorías en relación al efecto sobre microalgas: sustancia muy tóxica (CI50 menor a 1 mg L<sup>-1</sup>), sustancia tóxica (CI50 entre 1-10 mg L<sup>-1</sup>), sustancia perjudicial (CI50 entre 10-100 mg L<sup>-1</sup>) y sustancia no tóxica (CI50 mayor de 100 mg L<sup>-1</sup>). Teniendo en cuenta esta directiva, nuestros resultados mostraron que el antibiótico clortetraciclina (de uso veterinario) es muy tóxico para *P. subcapitata* y que la formulación Glifosato II Atanor es tóxica para *M. contortum* y *A. fusiformis*. Las distintas especies presentaron distinta sensibilidad a glifosato, siendo *P. kessleri* mucho más tolerante que *M. contortum* a la formulación Glifosato II Atanor®. Además, los resultados mostraron que 2 formulaciones distintas de glifosato tienen efectos distintos sobre la misma especie (*S. acutus*): una formulación es tóxica mientras que la otra no lo es. Tanto para el herbicida glifosato como para el imazetapir, los formulados que se aplican a campo son tóxicos, mientras que sus principios activos no lo son. De esta manera se pone en evidencia, a través de la evaluación de la respuesta de las microalgas, el problema de la toxicidad hacia los organismos no blanco de los aditivos presentes en las formulaciones comerciales.

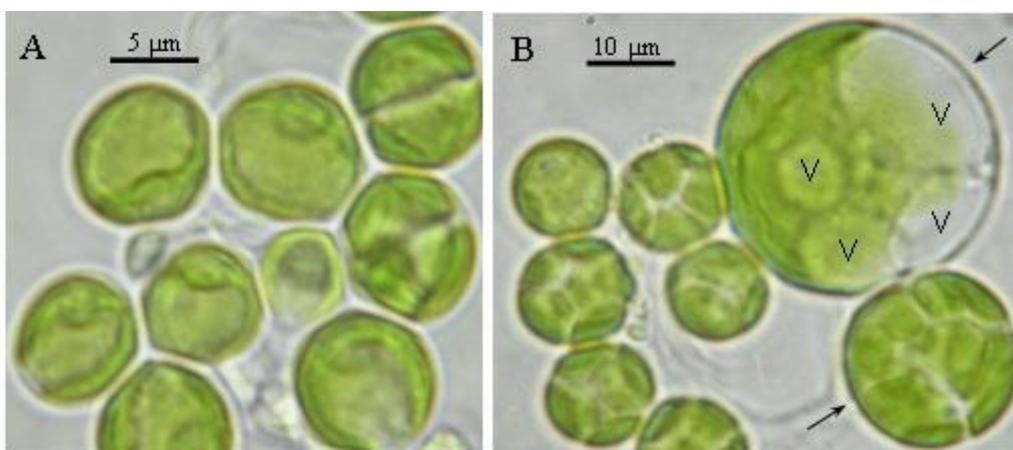
**Tabla 1:** Concentración inhibitoria 50 (CI 50) y clasificación de la peligrosidad de antibióticos de uso humano y veterinario y de herbicidas sobre microalgas.

<i>Especie</i>	<i>Contaminante</i>	<i>CI 50 (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Peligrosidad acuática*</i>
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Clortetraciclina	0,006	Muy Tóxico
	Gentamicina	19,2	Perjudicial
	Vancomicina	724	No Tóxico
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> **	Glifosato II Atanor® (p.a: sal de K)	6,5	Tóxico
<i>Monoraphidium contortum</i> **	Glifosato II Atanor® (p.a: sal de K)	3,5	Tóxico
<i>Parachlorella kessleri</i> **	Glifosato II Atanor® (p.a: sal de K)	47,4	Perjudicial
	Glifosato Atanor® (p.a: IPAG)	60	Perjudicial
<i>Scenedesmus acutus</i> **	Glifosato II Atanor® (p.a: sal de K)	14,7	Perjudicial
	Glifosato Atanor® (p.a: IPAG)	1,8	Tóxico
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	Glifosato Atanor® (p.a: IPAG)	4,8	Tóxico
	IPAG pura	326	No tóxico
	Verosil® (p.a: sal de amonio de imazetapir)	3,2	Tóxico
	Sal de amonio de imazetapir	> 500	No Tóxico

\* Clasificación de la Unión Europea Directiva N° 67/548/EEC; \*\* Especie nativa; p.a.: principio activo; IPAG: sal de isopropilamina de glifosato.

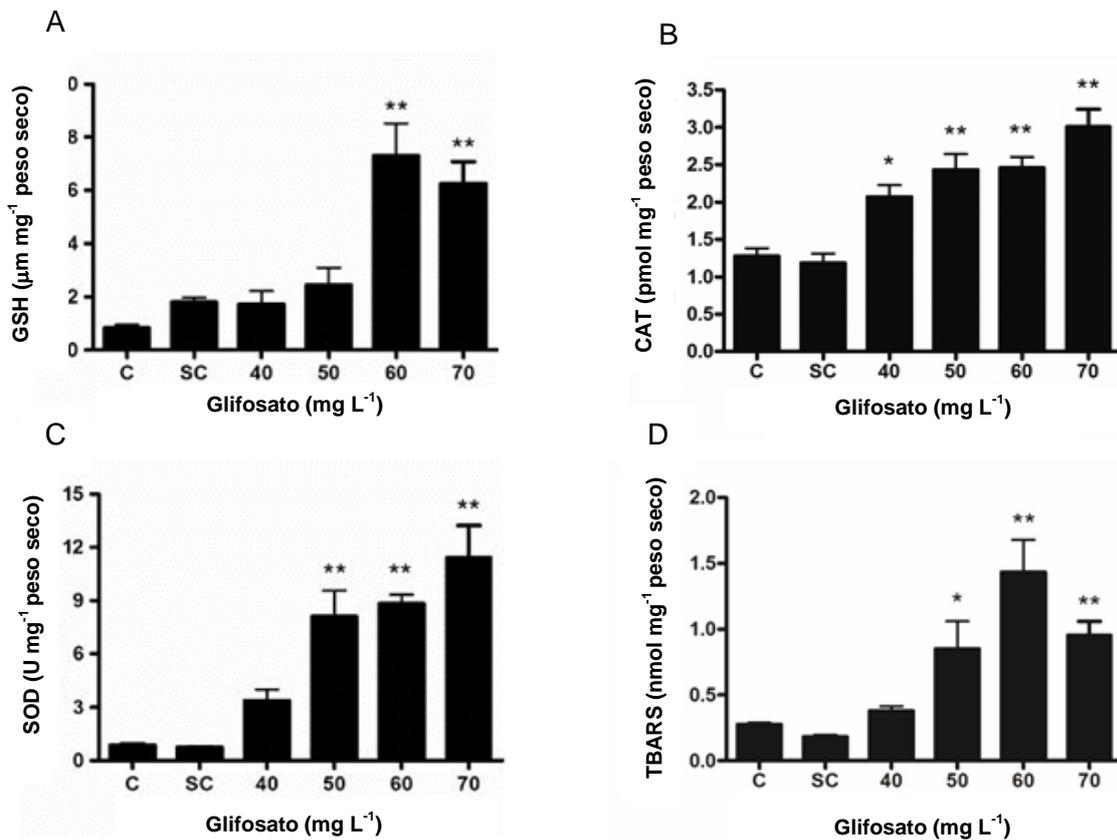
Además, otra serie de estudios realizados en nuestro laboratorio con microalgas expuestas a la formulación Glifosato Atanor® y a la formulación Verosil® (imazetapir) permitieron demostrar la toxicidad de esos herbicidas, la participación de estrés oxidativo en sus mecanismos de acción y la generación de alteraciones en la estructura celular de las microalgas.

En el trabajo de Romero *et al.* (2011) demostramos que *C. kessleri* (actualmente *P. kessleri*, Juárez *et al.*, 2011) es muy tolerante a la formulación Glifosato Atanor® (CI 50 de aproximadamente 60 mg L<sup>-1</sup>). Sin embargo, la exposición al herbicida provocó alteraciones en la morfología que se relacionaron con alteraciones en parámetros de estrés oxidativo. Se observó decoloración, desorganización celular, aumento de la vacuolización, aumento del biovolumen (Figura 4), aumento de los niveles de defensas antioxidantes (GSH, SOD y CAT) y aumento de peroxidación lipídica (Figura 5). Ese daño oxidativo, junto con la disminución de la relación clorofila *a/b*, se relaciona con la decoloración, la desorganización celular y cambios en el biovolumen.



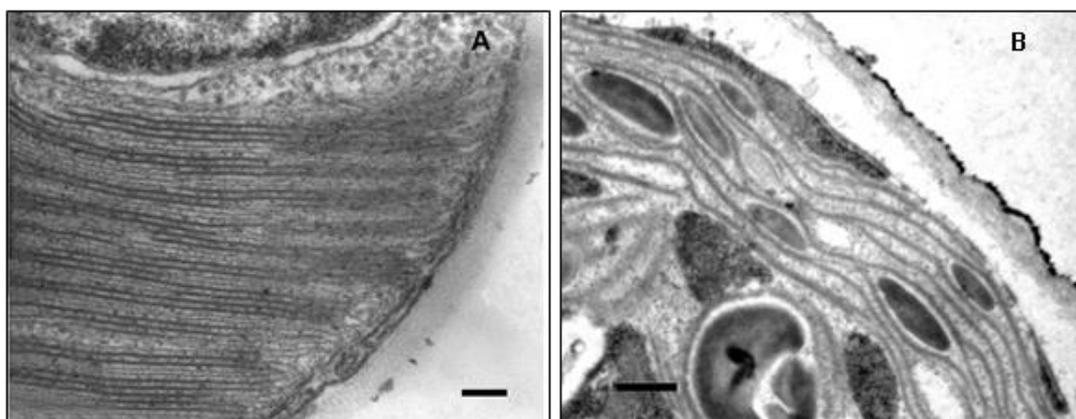
**Figura 4:** Efecto del glifosato Atanor sobre la morfología de *C. kessleri*. Células control (A) y células expuestas a 60 mg L<sup>-1</sup> (B). Incremento volumen celular (flecha); V: vacuolización. Tomado de Romero *et al.* (2011).

Los estudios que realizamos en *Scenedesmus vacuolatus*, sobre el efecto del glifosato e imazetapir, demostraron la toxicidad diferencial de formulaciones y principios activos, la participación de estrés oxidativo en sus mecanismos de acción y la generación de alteraciones en la estructura celular. Las formulaciones de ambos herbicidas (Glifosato Atanor® y Verosil®) provocaron disminución del crecimiento, decoloración, desorganización celular, aumento de vacuolización, aumento de biovolumen, aumento de los niveles de EROS, aumento de daño a lípidos y a proteínas y aumento de los niveles de GSH. Las defensas antioxidantes enzimáticas SOD y CAT aumentaron en las células expuestas a Verosil®, mientras que disminuyeron en las células expuestas a Glifosato Atanor® (Fassiano, 2016; Iumato, 2016).



**Figura 5:** Niveles de defensas antioxidantes y de daño oxidativo en *C. kessleri* expuesta a glifosato Atanor. Contenido de glutatión reducido (GSH) (A). Actividad catalasa (CAT) (B). Actividad superóxido dismutasa (SOD) (C). Contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (D). \*Diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) con respecto al control. Modificado de Romero *et al.* (2011).

Las alteraciones observadas en los parámetros de daño oxidativo y en las defensas antioxidantes indicarían que el estrés oxidativo estaría implicado en el efecto de esos herbicidas y pueden correlacionarse con alteraciones en la estructura celular. Por ejemplo, el aumento de daño oxidativo a lípidos y a proteínas puede relacionarse con la desorganización de las membranas tilacoidales (Figura 6).



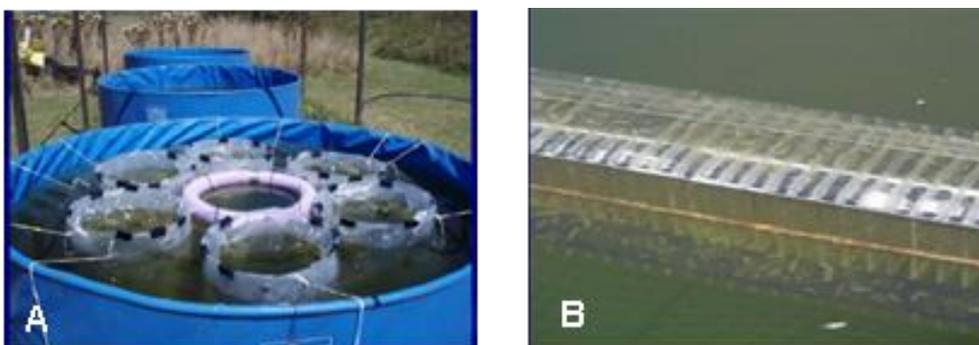
**Figura 6:** Imágenes representativas de la ultraestructura del cloroplasto de microalgas controles y expuestas a glifosato o imazetapir. Tilacoides con su patrón de apilamiento ordenado, característico de células bajo condiciones normales (escala: 100 nm) (A). Tilacoides dispuestos laxamente con pérdida del patrón de apilamiento, característico de células expuestas a glifosato o imazetapir (escala 500 nm) (B).

## Estudios a escala comunidad

Los estudios con microalgas también permiten un enfoque a escala de comunidades. El perifiton (al igual que el fitoplancton) es una comunidad importante en la producción primaria de los cuerpos de agua someros y corresponde a un ensamble de bacterias, microheterótrofos y, mayoritariamente, microalgas (Bricheux *et al.*, 2013). Es una comunidad sésil que se considera muy buena indicadora, ya que integra en el tiempo los efectos de los contaminantes presentes en el cuerpo de agua (Bonet *et al.*, 2014). Dado que se trata de una comunidad productora, al igual que para el caso del fitoplancton, las alteraciones que se produzcan en el perifiton también pueden afectar a todo el ecosistema acuático. Los estudios clásicos sobre el efecto de contaminantes en la comunidad perifítica se han realizado, principalmente, con

un enfoque ecológico (Debenest *et al.*, 2009; Montuelle *et al.*, 2010; Vera *et al.*, 2010). Por ejemplo, distintos estudios examinaron el impacto de diferentes formulaciones comerciales de glifosato (Roundup®, Vision®, Atanor®) y han reportado alteraciones en la estructura (Perez *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2010 y 2012; Bricheux *et al.*, 2013), en la biomasa total y en la biomasa de la fracción autotrófica de la comunidad (Vera *et al.*, 2010 y 2012). Pero ese tipo de estudios puede complementarse con la evaluación del estado de la comunidad a través del análisis de marcadores bioquímicos, tales como los parámetros indicadores de estrés oxidativo (peroxidación lipídica, actividad de enzimas antioxidantes, etc.).

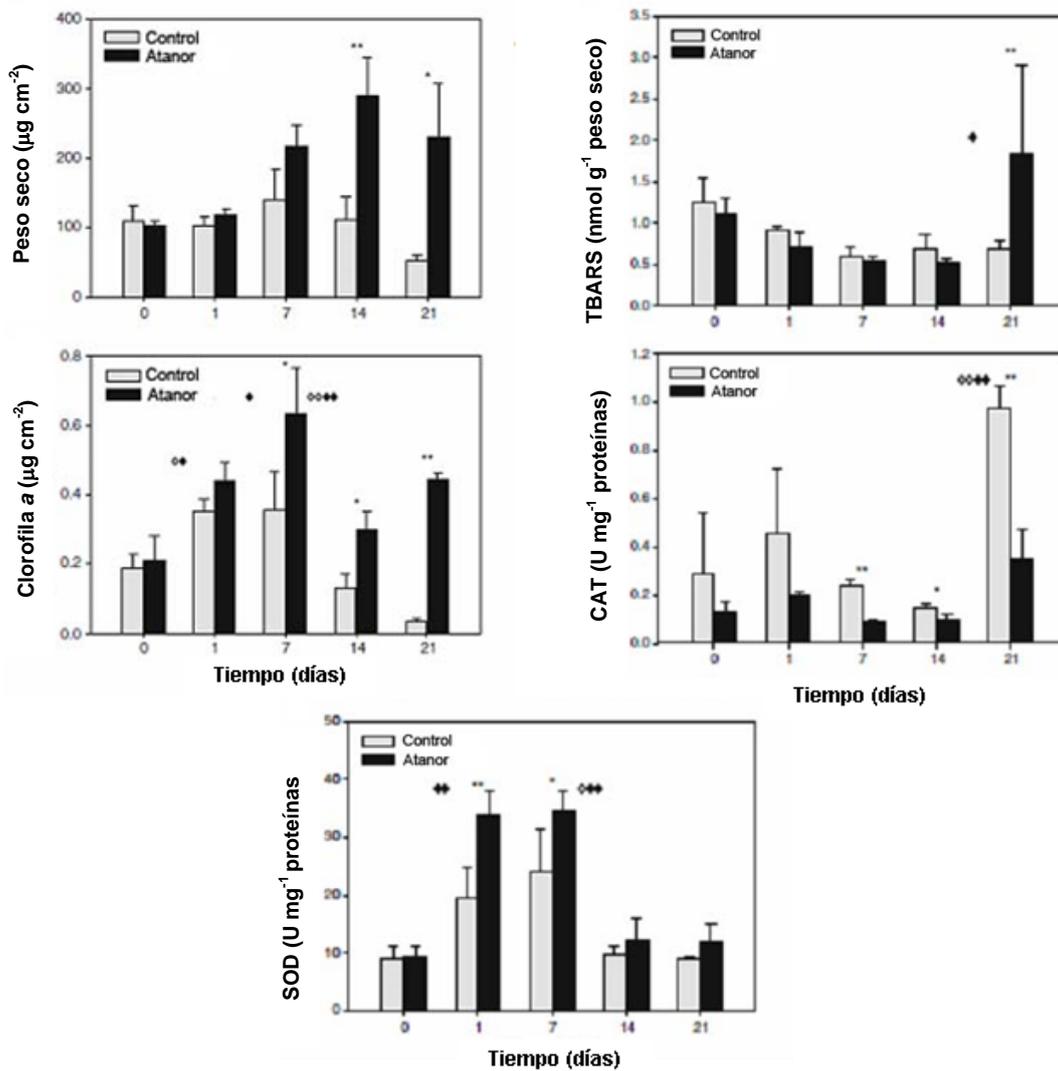
En una experiencia con microcosmos a cielo abierto, realizada en colaboración con nuestro laboratorio, se evaluó el efecto de la formulación Glifosato Atanor® sobre perifiton, analizando la alteración de parámetros de estrés oxidativo de la comunidad. Se establecieron microcosmos de 70 litros (controles y tratados con 3 mg p.a. L<sup>-1</sup> de Glifosato Atanor®) y se colocaron sustratos artificiales colonizados por perifiton (Figura 7).



**Figura 7:** Microcosmos a cielo abierto (A) y detalle de soporte conteniendo sustratos colonizados por perifiton (B).

Luego de la aplicación del herbicida, se analizó la biomasa, el contenido de pigmentos, los niveles de peroxidación lipídica (TBARS) y las actividades SOD y CAT, a lo largo de 21 días. Los resultados de este experimento (Vera *et al.*, 2012) demostraron que el Glifosato Atanor® produjo un aumento de biomasa total (medida como peso seco) y un aumento significativo de la

fracción autotrófica (microalgas), indicado por el aumento de clorofila a (Figura 8). También se demostró que la exposición a glifosato provocó, en la comunidad, alteraciones en parámetros relacionados a estrés oxidativo. Se detectó un aumento de actividad SOD y una disminución de la actividad CAT en los primeros tiempos de exposición y un aumento de daño a lípidos hacia el final de la experiencia (Figura 8).



**Figura 8:** Parámetros de biomasa y estrés oxidativo en perifiton expuesto a Glifosato Atanor®. Peso seco (A). Clorofila a (B). Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (C). Actividad catalasa (CAT) (D), Actividad superóxido dismutasa (SOD) (E). ◇ Diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) con respecto al control. Modificado de Vera *et al.* (2012).

Aunque se observó que el glifosato indujo una estimulación del crecimiento en la comunidad, los resultados de los análisis bioquímicos mostraron que el herbicida tuvo un impacto negativo sobre su metabolismo (Vera *et al.*, 2012). La evaluación de parámetros metabólicos y de estrés oxidativo puede complementar la información obtenida a través de los criterios clásicos de evaluación en comunidades y aportar una visión más completa del impacto del herbicida.

## **Reflexión final**

Las microalgas corresponden al nivel trófico que sostiene toda la biota del ecosistema acuático. Presentan una alta sensibilidad y una rápida respuesta a los tóxicos, lo cual las convierte en muy valiosos bioindicadores del impacto ambiental de esos compuestos y del peligro potencial que ellos pueden representar para otros organismos. La evaluación de los efectos de los contaminantes sobre las microalgas aporta información acerca de las diferencias de sensibilidad entre sus especies y, cuando los análisis involucran especies autóctonas, también puede aportar información relevante para las evaluaciones de riesgo ambiental y para la revisión y elaboración de regulaciones en regiones de nuestro país.

Un enfoque a distintas escalas y niveles permite lograr un entendimiento más claro del metabolismo de las microalgas, de sus adaptaciones y funcionamiento en el ecosistema y del impacto de los contaminantes sobre ellas y sobre el ambiente acuático. La inclusión del análisis de marcadores de estrés oxidativo puede constituir una alerta temprana del riesgo al que están expuestas la microalgas, los niveles tróficos que ellas sostienen y su ecosistema.

## **Agradecimientos**

Parte de los resultados presentados corresponden a trabajos realizados bajo financiamiento de la Universidad de Buenos Aires (UBACyT

20020120200176BA y 20020130100248BA), del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET 11220130100020CO) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT, PICT 2010-0908).

## Referencias Bibliográficas

- Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601-639.
- Bonet B, Corcoll N, Tlili A, Morin S, Guasch H. 2014. Antioxidant enzyme activities in biofilms as biomarker of Zn pollution in a natural system: An active bio-monitoring study. *Ecotoxicol Environ Saf* 103: 82-90.
- Bricheux G, Le Moal G, Hennequin C, Coffe G, Donnadieu F, Portelli C, Bohatier J, Forestier C. 2013. Characterization and evolution of natural aquatic biofilm communities exposed in vitro to herbicides. *Ecotoxicol Environ Saf* 88: 126-134.
- Cajaraville MP, Bebianno MJ, Biasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo O. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsular: a practical approach. *Sci Total Environ* 247: 295-311.
- Carlsson C, Johansson A-K, Alvan G, Bergman K, Kühler T. 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci Total Environ* 364: 67-87.
- Chapman RL. 2013. Algae: the world's most important "plants"—an introduction. *Mitig Adapt Strateg Glob Change* 18:5–12
- Debenest T, Pinelli E, Coste M, Silvestre J, Mazzella N, Madigou C, Delmas F. 2009. Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. *Aquat Toxicol* 93:11-17.
- Fassiano AV. 2016. Toxicodinamia del herbicida imazetapir en *Scenedesmus vacuolatus*: Efecto de un formulado comercial, sus componentes y la mezclas con glifosato. Transferencia en una cadena trófica. Tesis doctoral, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

- Geoffroy L, Dewez D, Vernet G, Popovic R. 2003. Oxyfluorfen toxic effect on (*S. obliquus*) evaluated by different photosynthetic and enzymatic biomarkers. *Arch Environ Contam Toxicol* 45: 445-452.
- Geoffroy L, Teisseire H, Couderchet M, Vernet G. 2002. Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of (*Scenedesmus obliquus*). *Pest Biochem Physiol* 72: 178-185.
- Iummato MM. 2016. Impacto del herbicida n-fosfometil glicina (glifosato) sobre la biota acuática. Estudios en: organismos – cadenas tróficas – comunidad perifiton. Tesis doctoral, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Juárez A, Barsanti L, Passarelli V, Evangelista V, Vesentini N, Conforti V, Gualtieri P. 2008. In vivo microspectroscopy monitoring of chromium effects on the photosynthetic and photoreceptive apparatus of *Eudorina unicocca* and *Chlorella kessleri*. *J Environ Monitor* 10: 1313-318.
- Juárez AB, Vélez CG, Iñíguez AR, Martínez DM, Rodríguez MC, Vigna MS, Ríos De Molina MC. 2011. A *Parachlorella kessleri* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) strain from an extremely acidic geothermal pond in Argentina. *Phycologia* 50: 413-421.
- Khan SJ, Roser DJ, Davies CM, Peters GM, Stuetz RM, Tucker R, Ashbolt NJ. 2008. Chemical contaminants in feedlot wastes: Concentrations, effects and attenuation. *Environ Int* 3: 839-859
- Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Bio Med* 47: 333-343.
- Lei A, Hul Z, Wang Y, Tam NF. 2006. Antioxidant responses of microalgae species to pyrene. *J Appl Phycol* 18: 67-78.
- Lipok J, Studnik H, Gruyaert S. 2010. The toxicity of Roundup® 360 SL formulation and its main constituents: glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs. *Ecotoxicol Environ Saf* 73: 1681-1688.
- Magdaleno A, Peralta Gavensky M, Fassiano AV, Ríos De Molina MC, Santos M, March H, Moretton J, Juárez AB. 2015a. Phytotoxicity and genotoxicity assessment of imazethapyr herbicide using a battery of bioassays. *Environ Sci Pollut Res* 22: 19194-19202.
- Magdaleno A, Sáenz ME, Juárez AB, Moretton J. 2015b. Effects of six antibiotics and their binary mixtures on growth of *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicol Environ Saf* 113: 72-78.

- Mallick N. 2004. Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. *J Plant Physiol* 161: 591-597.
- Matthiessen P, Arnold D, Johnson AC, Pepper TJ, Potgieter TG, Pulman KGT. 2006. Contamination in headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms. *Sci Total Environ* 367: 616-630.
- Ministerio de Economía de la Provincia de Buenos Aires. 2016. [http://www.ec.gba.gov.ar/areas/estudios\\_proyecciones/principales\\_cultivos.php](http://www.ec.gba.gov.ar/areas/estudios_proyecciones/principales_cultivos.php). Consulta en línea Diciembre de 2016.
- Montuelle B, Dorigo U, Bérard A, Volat B, Bouchez A, Tlili A, Gouy V, Pesce S. 2010. The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardières-Morcille experimental watershed (France). *Hydrobiologia* 657: 123-141.
- Moore MN, Depledge MH, Readmen JW, Leonard DRP. 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat Res* 552: 247-268.
- Murray LA, Raab A, Marr IL., Feldmann J. 2003. Biotransformation of arsenate to arsenosugars by (*Chlorella vulgaris*). *Appl Organometal Chem* 17: 669-674.
- Mussali-Galante P, Tovar-Sánchez E, Valverde M, Rojas del Castillo E. 2013. Biomarkers of exposure for assessing environmental pollution: from molecules to ecosystem. *Rev Int Ambie* 29: 117-140
- O'Kelly CJ, Littlejohn J. 1994-2004. Protist Image Data: <http://megasun.bch.umontreal.ca/protists/protists.html>.
- Perales-Vela HV, Peña-Castro JM, Cañizares-Villanueva RO. 2006. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* 64: 1-10.
- Pérez GL, Torremorell A, Mugni H, Rodríguez P, Vera MS, Do Nascimento M, Allende L, Bustingorry J, Escaray R, Ferraro M, Izaguirre I, Pizarro H, Bonetto C, Morris DP, Zagarese H, 2007. Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecol Appl* 17: 2310-2322.
- Pinto E, Sigaud-Kutner TCS, Leitao MAS, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P. 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J Phycol* 39: 1008-1018.
- Ríos de Molina MC. 2003. El estrés oxidativo y el destino celular. *Química Viva* 2: 17-28.
- Romero D. 2008. Estudios de toxicidad de una formulación de glifosato sobre *Chlorella kessleri* (Chlorophyta). Tesis de Licenciatura, Departamento de Biodiversidad y

Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

- Romero D, Ríos de Molina MC, Juárez AB. 2011. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 741-747.
- Sabatini SE, Juárez AB, Eppis MR, Bianchi L, Luquet CM, Ríos de Molina MC. 2009. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 1200-1206.
- Sarkar A, Ray D, Shrivastava AN, Sarker S. 2006. Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15: 333-340.
- Semple KT, Cain RB, Schmidt S. 1999. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiol Let*, 179: 291-300.
- Torres MA, Barros MP, Campos SCG, Pinto E, Rajamani S, Sayre RT, Colepicolo P. 2008. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* 71: 1-15.
- Tsui MT, Chu LM. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*: 52: 1189-1197.
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 64: 178-189.
- Vendrell E, Gomez de Barreda Ferraz D, Sabater C, Carrasco JM. 2009. Effect of glyphosate on growth of four freshwater species of phytoplankton: a microplate bioassay. *Bull Environ Contam Toxicol* 82: 538-542.
- Vera MS, Di Fiori E, Lagomarsino L, Sinistro R, Escaray R, Iummato MM, Juárez A, Ríos de Molina MC, Tell G, Pizarro H. 2012. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology* 21: 1805-1816.
- Vera MS, Lagomarsino L, Sylvester M, Pérez GL, Rodríguez P, Mugni H, Sinistro R, Ferraro M, Bonetto C, Zagarese H, Pizarro H. 2010. New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology* 19: 710-721.
- Wong PK. 2000. Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere* 41: 177-182.

Zhao L, Dong YH, Wang H. 2010. Residues of veterinary antibiotics in manures feedlot livestock in eight provinces of China. *Sci Total Environ* 408: 1069-1075.

## **Acerca de la autora**

Dra. ÁNGELA BEATRIZ JUARÉZ

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental y Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (UBA), Buenos Aires, Argentina. Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada (IBBEA) CONICET-UBA, Buenos Aires, Argentina.

Ángela Beatriz Juárez es Doctora en Ciencias Biológicas y Docente-Investigadora de la UBA. Realiza investigaciones relacionadas con cultivos de microalgas desde hace 20 años, llevando adelante aislamiento y cultivo de cepas. Ha sido curadora de la colección de cultivos de microalgas del Laboratorio de Ficología del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental desde 1992 hasta 2007 y actualmente está a cargo de la colección de cultivos del Laboratorio de Biología de Protistas, ambos laboratorios pertenecientes a la UBA. Ha dirigido 3 tesis de doctorado y varias tesis de grado. Su línea de investigación actual corresponde al "Cultivo de microalgas y estudio de los efectos de contaminantes ambientales sobre ellas (particularmente estrés oxidativo)".

# Aspectos bioquímicos y fisiológicos de la tolerancia al cromo por *Salvinia minima*

---

**Fernando Eduardo Prado, Mariana Rosa, Silvana Chocobar Ponce, Eduardo Pagano, Carolina Prado**

## RESUMEN

Los helechos flotantes del género *Salvinia* presentan un gran potencial para actuar como fitorremediadores de ambientes acuáticos contaminados con Cr(VI). Las investigaciones llevadas a cabo con *S. minima* revelaron que esta especie puede crecer y aún acumular niveles elevados de Cr cuando el pH de la solución es lo suficientemente bajo (pH = 4) para permitir el desarrollo de otras especies. El análisis de los parámetros fisiológicos y bioquímicos muestra también que es capaz de desarrollar mecanismos eficaces de defensa contra el estrés oxidativo inducido por el Cr(VI), que varían con la estacionalidad. La involucración/participación de enzimas antioxidantes así como de compuestos fenólicos solubles e insolubles y tioles proteicos y no proteicos en la tolerancia al Cr(VI) ha sido plenamente demostrada. Dicha tolerancia involucra además una participación clave del metabolismo de los carbohidratos. El estudio de la actividad respiratoria reveló además, una importante participación de la vía alternativa (AOX) y de la respiración residual en el mecanismo de tolerancia al Cr(VI).

**Palabras claves:** Cr(VI), bioquímica, fisiología, fitorremediación, helecho flotante, metabolismo, *Salvinia minima*

## El cromo en la naturaleza

El cromo (Cr) es un metal de transición que se encuentra en el grupo VI de la Tabla Periódica de los elementos, con número atómico 24. Su peso atómico es 51,996 UMA (Unidad de Masa Atómica), su densidad 7,19 g cm<sup>-3</sup>,

su punto de fusión 1875 °C y su punto de ebullición 2665 °C. Es un metal duro, quebradizo, de color gris acerado brillante, con configuración electrónica que lo hace muy resistente a la acción de los oxidantes atmosféricos por lo que es muy utilizado para prevenir la corrosión. Por su ubicación en la Tabla Periódica puede presentar los números de oxidación 0, +2, +3, +4, +5 y +6, pero en la naturaleza solo se encuentra en los estados +3 [Cr(III)] y +6 [Cr(VI)] que son estables y persistentes (Zayed y Terry, 2003). El Cr(III) es un catión que produce hidróxidos coloidales y compuestos estables, formando parte de la cromita ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ) que es el mineral de Cr más abundante en la naturaleza y del cual deriva su nombre. El Cr(VI), aunque está presente en el mineral crocoita ( $\text{PbCrO}_4$ ), rara vez se lo encuentra en la naturaleza, pero es altamente soluble en agua y forma aniones divalentes como cromato  $[(\text{CrO}_4)^{-2}]$  y dicromato  $[(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{-2}]$  que son fuertemente oxidantes (Deer *et al.*, 2013). Las formas Cr(III) y Cr(VI) son fácilmente interconvertibles dependiendo la dirección de conversión del pH de la solución, de su potencial redox, de la disponibilidad de oxígeno y de la temperatura. Así, en medio alcalino y presencia de  $\text{O}_2$  (aerobiosis) se favorece la oxidación de Cr(III) a Cr(VI); siendo más intensa a temperaturas elevadas (Verbinnen *et al.*, 2013). La oxidación de Cr(III) también ocurre a pHs bajos en presencia de óxidos de Mn debido a la participación de iones hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) tanto en la oxidación del Cr como en la reducción del Mn (Fendorf, 1995).

## Toxicidad del cromo

El Cr(III), a bajas concentraciones es considerado un elemento esencial para los animales y el hombre aunque no se conocen con exactitud sus funciones, se ha postulado que participa en el metabolismo de los hidratos de carbono a través de la potenciación de la acción de la insulina (Krejpcio, 2001), y en el lipídico vía conversión de la glucosa en lípidos (gluconeogénesis) en los adipocitos (Vincent, 2000). Sin embargo a concentraciones elevadas el Cr(III) se torna tóxico para los organismos animales (Levita y Lay, 2008). El Cr(VI), en cambio, aún a bajas concentraciones tiene efectos altamente tóxicos para todos los seres vivos (Mishra y Bharagava, 2016). Debido a su mayor

solubilidad y facilidad para atravesar las membranas celulares el Cr(VI) es más fácilmente absorbido por las células que el Cr(III). Por otra parte, el hecho comprobado de que atraviesa la placenta significa un alto riesgo para los embriones y fetos (Marouani *et al.*, 2011). El Cr(VI) puede actuar como oxidante directamente en la superficie de la piel o pasar a través de ella, mayormente cuando existe algún tipo de lesión o herida lo que puede ocasionar intoxicaciones agudas. Estas se manifiestan como lesiones cutáneas (dermatitis) o renales (Hassmanova *et al.*, 2000). Las intoxicaciones crónicas pueden producir acumulaciones del metal en hígado, riñón, glándula tiroidea y médula ósea así como inducir mutaciones a nivel del tracto gastrointestinal (Saha *et al.*, 2011). Contrariamente a lo que ocurre con los compuestos de Cr(VI), no fue posible demostrar en forma concluyente efectos carcinogénicos de los compuestos de Cr(III) en animales de experimentación. El Cr(VI) ha sido clasificado como posible carcinógeno para los humanos (Grupo 1 – Agencia Internacional de Investigaciones en Cáncer) (EFSA, 2014).

## **El cromo y las plantas**

En el caso de las plantas aunque existen algunos reportes describiendo posibles efectos benéficos del Cr(III) (Zeid, 2001; Sinha *et al.*, 2008), la mayor parte de los estudios efectuados se han centrado en el Cr(VI) dado que es altamente tóxico produciendo estrés oxidativo y causando severos efectos deletéreos sobre el metabolismo vegetal (Prado *et al.*, 2015). Entre los parámetros metabólicos y fisiológicos afectados por el Cr(VI) se destacan la fijación fotosintética de CO<sub>2</sub>, la partición de carbohidratos, la tasa respiratoria, el metabolismo lipídico, la asimilación de nutrientes, la tasa de crecimiento y la producción de biomasa, entre otros (Oliveira, 2012; Singh *et al.*, 2013; Prado *et al.*, 2015). En relación a la toxicidad del Cr(VI) sobre el metabolismo vegetal, en los últimos años, han comenzado a generarse serias dudas sobre su real significado. En efecto, si bien, el Cr(VI) induce un estrés oxidativo más severo que el Cr(III) (Chatterjee *et al.*, 2015), diversos estudios han demostrado que buena parte del Cr(VI), o posiblemente todo, es reducido a Cr(III) al entrar en contacto con la raíz y/o en el interior de los tejidos (Duarte *et al.*, 2012; Santana

*et al.*, 2012). Así por ejemplo se demostró que más del 95% del Cr(VI) acumulado en *Portulaca oleracea* es reducido a Cr(III) dentro de la planta (Ayman *et al.*, 2014). En este contexto cabe preguntarse cuál especie de Cr es la realmente tóxica para las plantas?.

## **Fitorremediación del cromo**

El creciente incremento de las actividades mineras e industriales vinculadas al Cr, ha conducido en las últimas décadas a niveles extremos de contaminación por este metal que en muchos casos resultan muy peligrosos no solo para el hombre sino para la biota en general (Oliveira, 2012). Ello llevó a numerosos países a abocarse al estudio de la problemática de la contaminación por Cr, principalmente Cr(VI), a fin de implementar mecanismos o tecnologías que permitan su eliminación y/o disminución de su contenido de los sitios contaminados (Jeyasingh *et al.*, 2010; Barakat, 2011). Aunque existen diversas tecnologías para eliminar el Cr del ambiente, son muy onerosas y resultan de difícil implementación sobre todo cuando se trata de grandes superficies de terreno o volúmenes de efluentes (Madhavi *et al.*, 2013). Ante este panorama surge la fitorremediación como técnica de bajo costo y relativamente fácil de implementar para la descontaminación de Cr (Ali *et al.*, 2013; SitiZubaidah y NiK Ismail Azlan, 2013). Aunque la fitorremediación engloba el uso de organismos vegetales vivos o muertos o bien partes de ellos (Miretzky y Fernandez Cirelli, 2010), en la actualidad el empleo de este término ha quedado restringido sólo a plantas y algas (Ali *et al.*, 2013; Chekroun y Baghour, 2013). La fitorremediación comprende diferentes procesos y mecanismos: fitoextracción, fitovolatilización, fitodegradación, fitoestimulación, fitoestabilización y rizofiltración, siendo este último el más importante y el de mayor trascendencia. Aunque originalmente el término rizofiltración se refería al empleo de plantas acuáticas, con posterioridad el mismo fue extendido a las plantas terrestres cultivadas en hidroponía (Dushenkov *et al.*, 1995).

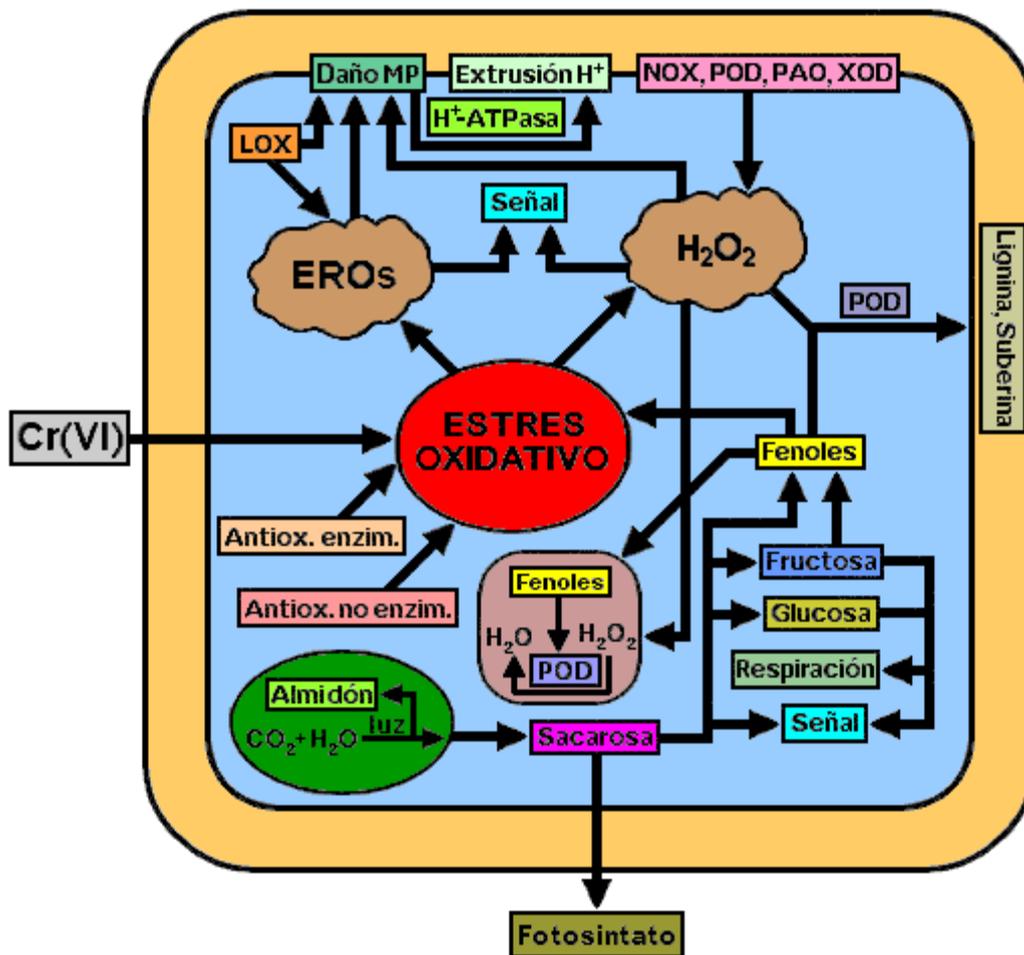
Las plantas más óptimas para la rizofiltración son aquellas con gran producción de biomasa y capacidad de retirada de metales durante largos periodos de tiempo (Zayed y Terry, 2003). Desde hace bastante tiempo se

conoce la habilidad que tienen las plantas acuáticas para absorber contaminantes metálicos y depurar los cuerpos de agua (Prasad, 2007; Srivastava *et al.*, 2008; Dhir, 2013). Por su elevada capacidad removedora de metales pesados, particularmente Cr, se destacan las especies de los géneros *Salvinia* y *Azolla*, helechos flotantes presentes en las regiones tropicales, subtropicales y templadas cálidas de todo el mundo. El género *Salvinia* comprende cerca de 15 especies, de las cuales 7 son nativas de América y dentro de ellas 4 se encuentran en Argentina. Se trata de plantas de agua dulce que forman pequeñas matas que flotan libremente en aguas tranquilas. Poseen tallo rizomatoso horizontal, poco dividido y lleva 3 hojas en cada nudo: dos superiores flotantes y una inferior sumergida, desprovista de lámina, cuyas nervaduras forman lacinias filiformes las cuales hacen la función de raíces. El género *Azolla* comprende cerca de 9 especies ampliamente distribuidas en América, India, Australia, Africa, Japón, Nueva Zelanda y Hawaii. Son plantas de hojas pequeñas con raíces cortas. Poseen frondes divididas con colores que oscilan entre rojo a púrpura a pleno sol y de verde pálido a verde azulado en la sombra. Forman relaciones simbióticas con *Anabaena azollae* (cianobacteria) lo que le permite fijar el nitrógeno atmosférico. Las especies de *Salvinia* y *Azolla* se caracterizan por presentar una elevada tasa de crecimiento siendo capaces de duplicar sus poblaciones en aproximadamente 2-4 días con mínimo suministro de nutrientes (Nichols *et al.*, 2000; Arora y Saxena, 2005). Debido a su rápido crecimiento y facilidad para prosperar en diversos ambientes acuáticos, incluso en aquellos que presentan un alto grado de contaminación metálica, ha hecho que varias especies de *Salvinia* y *Azolla* se hayan convertido en objeto de diversos estudios para la restauración de ambientes acuáticos contaminados. Entre las especies más utilizadas en estudios sobre la fitorremediación de Cr(VI) podemos mencionar: *Salvinia minima*, *S. molesta*, *S. natans*, *S. rotundifolia*, *S. herzogii* y *S. auriculata* (Espinoza-Quiñones *et al.*, 2008; Dhir *et al.*, 2009; Prado, *et al.*, 2010; Maine *et al.*, 2016; Pati y Satapathy, 2016), y *Azolla filiculoides*, *A. caroliniana*, *A. pinnata* y *A. rubra* (Bennicelli *et al.*, 2004; Shiny *et al.*, 2004; Arora *et al.*, 2006; Rai, 2010; Zhao y Duncan, 2010; Pati y Satapathy, 2016). El potencial uso de los helechos flotantes como agentes fitorremediadores de Cr ha recibido mucha

atención en los últimos tiempos; sin embargo, a pesar de la abundancia de trabajos acerca de su uso en procesos de fitorremediación, la mayoría de ellos se circunscriben a la capacidad acumuladora y muy pocos a los efectos del metal sobre los parámetros fisiológicos y bioquímicos de la planta. Los estudios sobre la influencia de las variables climáticas y fisicoquímicas del medio de crecimiento así como las interacciones entre ambas, resultan más escasos aún. Esto motivó que el trabajo de nuestro grupo se enfocara fundamentalmente en el estudio de las interrelaciones metabólicas que tienen lugar en las hojas flotantes (frondes) y sumergidas (lacinias) de *S. minima* y en la actualidad también de *S. rotundifolia*, cuando crecen en presencia de Cr(VI), y cómo resultan afectadas por la estacionalidad y las características fisicoquímicas del medio. Para ello establecimos un modelo de célula ideal (Figura 1) y a partir de ella planteamos el estudio e interpretación de las siguientes premisas:

- Mecanismos utilizados por las plantas para absorber, transportar, almacenar y/o metabolizar el Cr(VI) en relación al metabolismo primario y secundario.
- Efecto de las variables climáticas sobre dichos mecanismos y sobre la performance removedora de las plantas.
- Influencia de los parámetros fisicoquímicos del medio de cultivo sobre la capacidad removedora de Cr(VI).
- Efecto del Cr(VI) sobre la expresión de proteínas redox vinculadas al metabolismo tiólico.

En forma paralela se llevaron adelante estudios referidos a los parámetros de crecimiento, así como anatómicos y ultraestructurales mediante microscopía óptica (MO) y electrónica de transmisión (TEM). En el marco de las investigaciones que se llevan a cabo, en los últimos años se comenzó a estudiar también la posible toxicidad del Cr(III) sobre diferentes especies de *Salvinia*.



**Figura 1:** Modelo hipotético de célula de *Salvinia minima* expuesta al Cr(VI) mostrando los parámetros bioquímicos y sus interrelaciones analizados en la presente investigación. Modificado de Podazza *et al.* (2016).

### Tolerancia de *Salvinia minima* y *Salvinia rotundifolia* al cromo

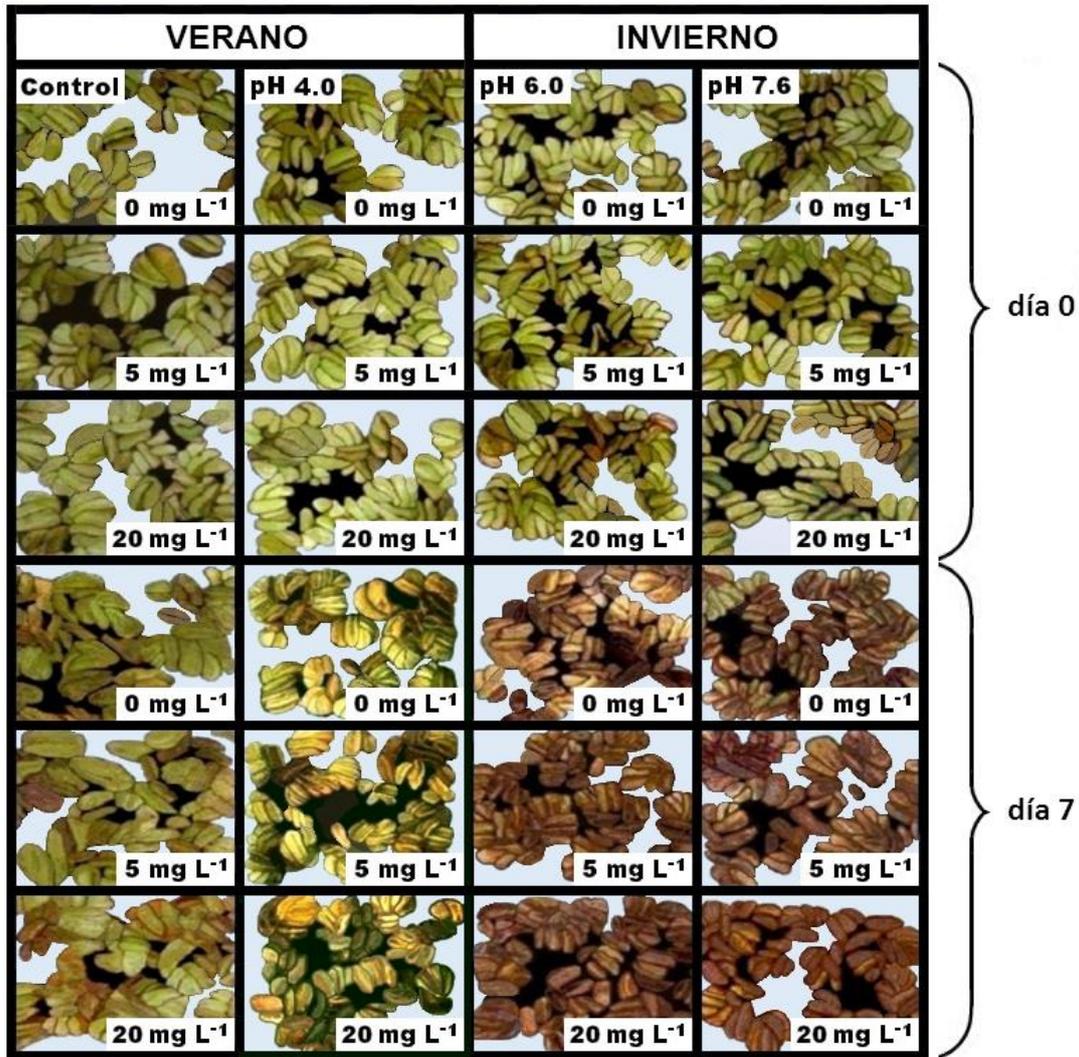
A fin de minimizar la influencia de la composición mineral de la solución de crecimiento, todos los estudios realizados hasta el presente se llevaron a cabo usando soluciones de Cr(VI) preparadas únicamente con agua de red. Las plantas de *S. minima* provienen de un pequeño embalse artificial ubicado a 500 msnm en la Reserva Experimental de Horco Molle (REHM) (S 26° 50', O 65° 12') perteneciente a la Facultad de Ciencias Naturales e IML de la Universidad Nacional de Tucumán. Por su parte, las plantas de *S. rotundifolia* provienen de la provincia de Corrientes y fueron adquiridas en un vivero

comercial. Para estudiar la influencia de la estacionalidad las plantas de *S. minima* se colectaron en los meses de Junio (plantas de invierno) y Noviembre (plantas de verano), respectivamente. A fin de eliminar la situación de estrés que se produce en las plantas al ser removidas de su medio natural, luego del traslado al laboratorio, se las trasplantó a contenedores de plástico de 140 L de capacidad llenos con agua de red y se dejaron al aire libre durante 3 días a resguardo de la insolación directa (periodo de recuperación). Este período de recuperación resulta necesario para el restablecimiento y normalización de los parámetros fisiológicos y metabólicos de las plantas. Al cabo del mismo las plantas recuperan su crecimiento vigoroso. Con las plantas de los contenedores se llevaron a cabo ensayos en condiciones controladas (laboratorio) y naturales (al aire libre) (Prado, 2011). Para los ensayos bajo condiciones controladas las plantas se cultivaron en bandejas de policarbonato (baja capacidad adsorbente de Cr) conteniendo, ya sea, agua de red (control) o solución de  $K_2Cr_2O_7$  de distinta concentración, preparada con agua de red. Las condiciones de cultivo utilizadas fueron: fotoperiodo 14/10 h (día/noche), temperatura 25/20 °C (día/noche), humedad relativa 60% e iluminación fotosintéticamente activa (PAR) de  $190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a nivel de las plantas. La iluminación PAR fue suministrada por 12 lámparas fluorescentes (Philips TL/40, Argentina) y fue medida con un sensor cuántico (LI-190SA, Li-Cor, Lincoln, USA). Para los ensayos en condiciones naturales se usaron recipientes de poliestireno expandido (Telgopor<sup>®</sup>) por ser aislantes y tener baja conductividad térmica. Luego del trasplante de las plantas, los recipientes fueron colocados en la azotea del edificio de la Facultad de Ciencias Naturales e IML donde se dejaron expuestos durante 7 días a las condiciones climáticas prevalecientes en la región. Los recipientes se ubicaron debajo de un armazón de hierro cubierto por un film de polietileno a 90 cm de la superficie de los recipientes y, a su vez, debajo de un árbol de gran porte no muy frondoso permitiendo el paso de una buena parte de la radiación solar. Esta disposición se hizo para evitar la dilución o concentración de la solución de tratamiento por el agua de lluvia o la excesiva radiación solar durante el ensayo de verano, y el exceso de polvo y/o material en suspensión proveniente de la quema de la caña de azúcar durante el ensayo de invierno. En estas condiciones la temperatura de la

solución en los recipientes, no varió en más de 1,5 °C respecto a la temperatura del aire durante los días más calientes y más fríos respectivamente. La pérdida de agua por evaporación y/o transpiración fue compensada diariamente añadiendo agua de red hasta el volumen inicial marcado en cada recipiente. Para evitar grandes variaciones en la concentración de Cr las soluciones de tratamiento se renovaron totalmente a los 3 días de iniciado el ensayo. Los ensayos en condiciones controladas no mostraron diferencias significativas en la acumulación de Cr así como en los parámetros de crecimiento y fisiológicos entre plantas colectadas en verano e invierno. La acumulación de Cr fue significativamente mayor en lacinias que en frondes, indicando un menor transporte hacia la parte aérea. Los estudios referidos a la actividad respiratoria, concentración de carbohidratos solubles (sacarosa, glucosa y fructosa), actividad de enzimas hidrolizantes de sacarosa (invertasa y sacarosa sintasa) y contenido de compuestos fenólicos solubles, pusieron en evidencia que el Cr(VI) induce cambios significativos en los metabolismos primario y secundario tanto en las hojas flotantes como sumergidas de plantas de *S. minima*. Las mediciones de la actividad respiratoria en presencia y ausencia de cianuro y de ácido salicilhidroxámico (SHAM), permitieron establecer que el Cr(VI) induce no solo una actividad cianuro resistente vía oxidasa alternativa (AOX) sino también una actividad respiratoria residual insensible al cianuro y SHAM en frondes y lacinias; siendo esta la primera vez que se demuestra la presencia de ambas actividades en un helecho de agua dulce (Prado *et al.*, 2010). Se demostró asimismo una mayor contribución de la respiración alternativa a la respiración total así como la existencia de una correlación positiva entre los niveles de compuestos fenólicos solubles y las respiraciones residual y alternativa en las frondes expuestas al Cr(VI) (Prado *et al.*, 2013). En ese contexto, los cambios en la actividad respiratoria y en las actividades de las enzimas relacionadas al metabolismo de la sacarosa, jugarían un papel clave en la detoxificación del Cr(VI). Los trabajos realizados aportaron también evidencias importantes acerca de la participación de la respiración alternativa y residual en la ruta biosintética de los fenilpropanoides en las plantas expuestas al Cr(VI). Por otra parte, el estudio del efecto del pH de la solución de tratamiento reveló que la

absorción de Cr(VI) por *S. minima* fue dependiente no solo del valor del pH, sino también de la capacidad buffer de la solución. En condiciones de pH constante (solución con capacidad buffer) y pH variable (solución sin capacidad buffer) la absorción de Cr(VI) fue mayor en condiciones de acidez y menor en condiciones próximas a la neutralidad o alcalinas:  $4,0 > 6,0 > 7,6$ . Este hecho afianza el potencial fitorremediador de *S. minima* dada la mayor solubilidad del Cr(VI) entre pH 3,5 y 5,5. Los patrones de acumulación, sin embargo, fueron diferentes indicando que el pH de la solución así como su capacidad buffer resultan claves en la absorción del Cr(VI). Resulta interesante destacar que *S. minima* no solo puede acumular niveles elevados de Cr(VI) en condiciones ácidas sino también que puede crecer aun cuando el pH de la solución sea lo suficientemente bajo para permitir el desarrollo de otras especies. En ese mismo sentido, al cabo de 7 días de exposición al Cr(VI) las plantas cultivadas a pH 4 muestran síntomas de daño menos severos que los observados en las plantas cultivadas a pH 6 y 7,6 (Figura 2). En forma paralela, se demostró que la reducción de Cr(VI) a Cr(III), ya sea, a nivel superficial o en el interior de las células (Aldrich *et al.*, 2003) fue más pronunciada a pH ácido (Chocobar Ponce *et al.*, 2014).

Los estudios de microscopia óptica no revelaron diferencias significativas a nivel celular y tisular entre frondes control y expuestas al Cr(VI) de *S. minima* tanto en vista paradermal como en transcorte. De modo similar, tampoco se observaron diferencias significativas en los parámetros anatómicos cuantificados (densidad estomática, longitud de estomas, índice estomático y densidad de tricomas). El espesor de los tejidos medidos en los transcortes de frondes no mostró cambios significativos entre las plantas expuestas y no expuestas al Cr(VI) (Prado, 2011).

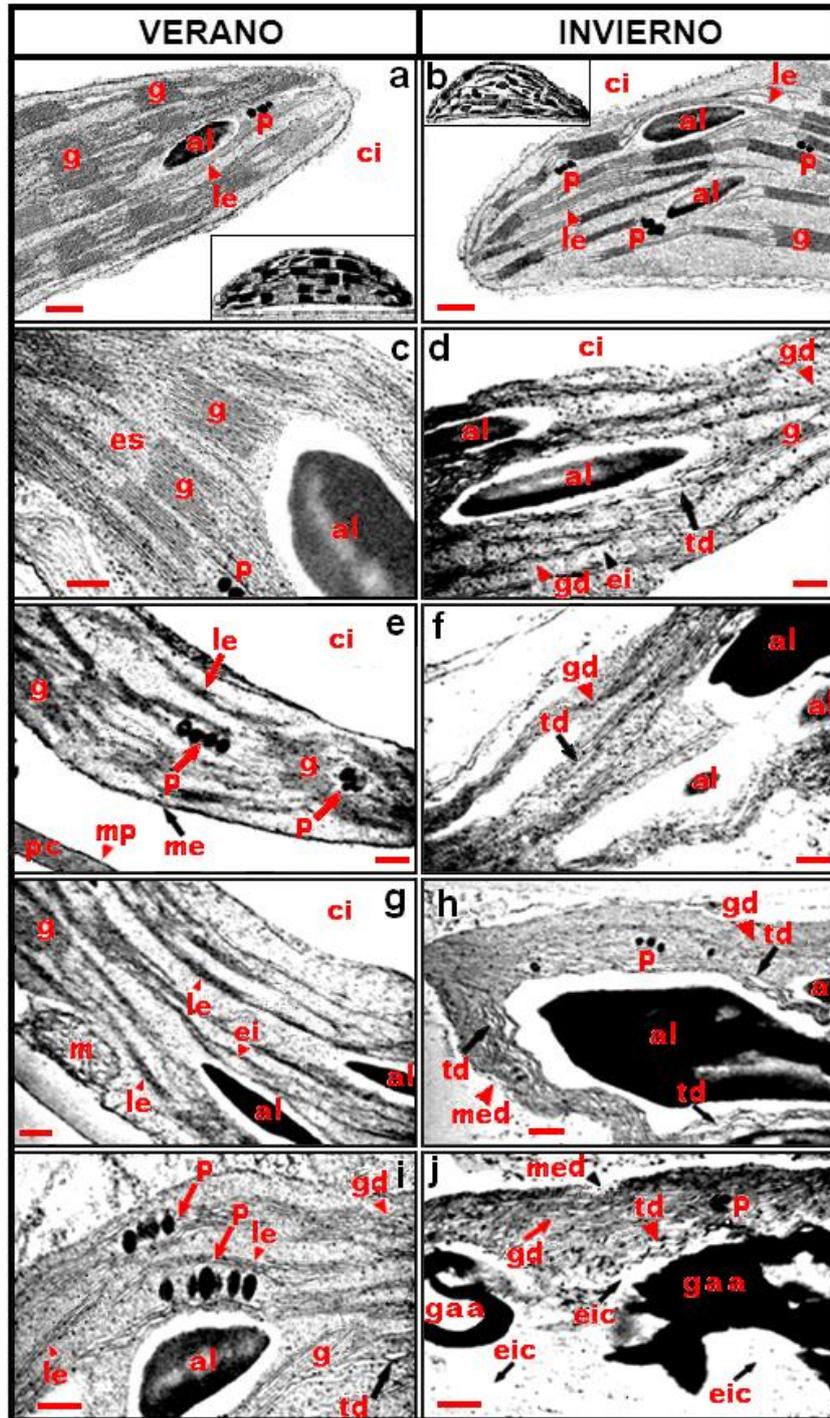


**Figura 2:** Patrón temporal de daño visual producido por la exposición de *S. minima* a diferentes concentraciones de Cr(VI) en función del pH de la solución de tratamiento. Modificado de Chocobar Ponce *et al.* (2014).

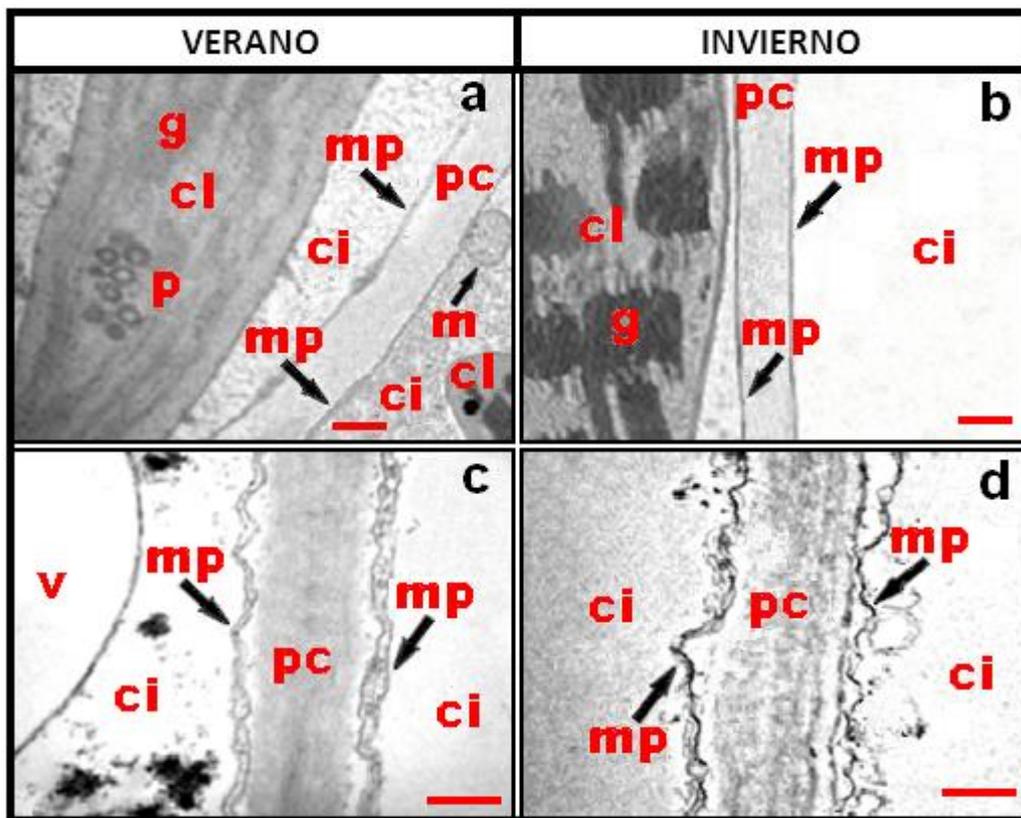
Los trabajos en condiciones de naturales llevados a cabo en dos estaciones contrastantes: verano e invierno, mostraron que la estacionalidad tiene una fuerte influencia no solo en la capacidad acumuladora de Cr(VI) por *S. minima* sino también en sus parámetros fisiológicos y bioquímicos. Los resultados obtenidos mostraron una significativa disminución en la acumulación del metal durante el invierno, indicando que la absorción de Cr(VI) por las lacinias es un proceso metabólicamente activo. Asimismo la tasa de crecimiento relativo ( $R_n$ ) mostró que el crecimiento vegetativo fue más afectado por el Cr en invierno que en verano. Los parámetros bioquímicos mostraron

una gran variabilidad entre hojas flotantes y sumergidas en función de la concentración de Cr(VI) utilizada y de la estación en la cual se realizaron las mediciones. Así las hexosas (glucosa y fructosa) en ambos tipos de hojas fueron más altas en invierno que en verano; en tanto que, la sacarosa, en la misma estación, fue más alta sólo en lacinias, ya que en frondes sus niveles fueron más elevados en verano. El contenido de almidón también mostró diferencias significativas entre frondes y lacinias como resultado de la exposición al metal y/o por la estacionalidad; factores que, en mayor o menor medida, afectan el metabolismo de los carbohidratos. En ese contexto, las enzimas relacionadas al metabolismo de la sacarosa tales como invertasa ácida (IA), sacarosa sintasa (SS) y sacarosa-6-fosfato sintasa (SPS) también mostraron gran variabilidad no solo en la actividad sino en el patrón distributivo, ya sea, en función de la concentración de Cr(VI) o de la estacionalidad. Por su parte, los contenidos de malondialdehído (MDA) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) así como las actividades de las enzimas lipoxigenasa (LOX), superóxido dismutasa (SOD) y guayacol peroxidasa (G-POD) fueron significativamente más altos en las lacinias expuestas al Cr(VI), sugiriendo un estrés oxidativo más intenso inducido por el metal. Sin embargo, el patrón distributivo estacional fue diferente con los mayores incrementos observados en invierno, lo que lleva a suponer que las bajas temperaturas también colaboran en la inducción del estrés oxidativo. Curiosamente la actividad catalasa (CAT) no aumentó significativamente en las plantas expuestas al Cr(VI), mostrando incluso disminuciones en su actividad. Este hecho permite inferir que en las hojas de *S. minima* la eliminación del tóxico H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realiza preferentemente con intervención de la enzima G-POD (Prado *et al.*, 2012). La participación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la detoxificación de radicales libres a través de compuestos fenólicos en el interior de la vacuola así como en la síntesis de lignina en la pared celular, ambas mediadas por peroxidasas solubles (PODs), ha sido demostrada en diferentes especies vegetales sometidas a estrés por metales pesados (Fecht-Christoffers *et al.*, 2006; Michalak, 2006). Frente a estos hallazgos, la ocurrencia de un proceso similar en las hojas de *S. minima* expuestas al Cr(VI) no puede descartarse. En este sentido, los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo mostraron incrementos significativos en los compuestos

fenólicos solubles en las frondes, así como niveles más altos de compuestos fenólicos insolubles acompañado de una mayor deposición de lignina en las paredes celulares de las lacinias (Prado et al., 2010). Los compuestos tiólicos proteicos y no-proteicos también mostraron un fuerte incremento en las hojas sumergidas, lo que indicaría que en la detoxificación del Cr(VI) también participan compuestos de naturaleza tiólica. Así pudo establecerse la existencia de mecanismos antioxidantes diferenciales entre frondes y lacinias. En las primeras, el mecanismo operante estaría relacionado a la acumulación de tioles y compuestos fenólicos solubles en las vacuolas con la finalidad de quelar y/o reducir dentro de ellas el Cr(VI) incorporado. Mientras que en las segundas el mecanismo operaría a través de la acumulación de compuestos fenólicos polimerizados (fenoles insolubles) a nivel de la pared celular con la finalidad de inmovilizar el metal, restringiendo su entrada a las células y posterior movilización hacia la parte aérea (Prado et al., 2012). Los estudios de microscopia electrónica de transmisión revelaron profundas diferencias en las alteraciones inducidas por el Cr(VI) en la ultraestructura de los cloroplastos y de la membrana plasmática entre plantas cultivadas en verano e invierno (Prado et al., 2015). En todas las concentraciones de Cr(VI) empleadas, los daños fueron mucho más intensos en las frondes de invierno (Figuras 3 y 4).

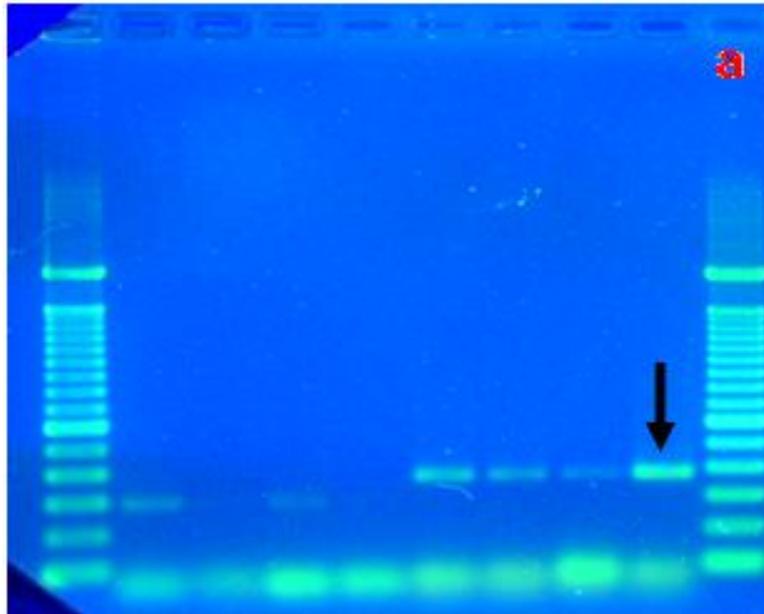


**Figura 3:** Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de cloroplastos de frondes de *S. minima* colectados en invierno y verano en ausencia (a,b) y presencia de 2 mg L<sup>-1</sup> (c,d), 5 mg L<sup>-1</sup> (e,f), 10 mgL<sup>-1</sup> (g,h) y 20 mg L<sup>-1</sup> (i,j) de Cr(VI). al: almidón, ci: citoplasma, ei: espacio intratilacoidal, eic: espacio intratilacoidal claro, es: estroma, g: grana, gaa: grano anormal de almidón, gd: grana desorganizada, le: lamela estromática, m: mitocondria, me: membrana externa, med: membrana externa desorganizada, mp: membrana plasmática, p: plastoglobuli, pc: pared celular, td: tilacoide desorganizado. Barra = 1 µm. Modificado de Prado *et al.* (2015).



**Figura 4:** Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la membrana plasmática de células de frondes de verano e invierno de *S. minima* sin exposición al Cr(VI) (a,b) y expuestas a 20 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) (c,d). **ci:** citoplasma, **cl:** cloroplasto, **g:** grana, **m:** mitocondria, **mp:** membrana plasmática, **p:** plastoglobuli, **pc:** pared celular, **v:** vacuola. Barra = 0,5 μm. Modificado de Prado *et al.* (2015).

El análisis molecular reveló la expresión en las hojas sumergidas de verano expuestas a 20 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) de un fragmento completo de Trx h 1 de 377 pb, con alta homología respecto a las Trxs h 1 de *Pisum sativum*, *Galega orientalis* y *Glycine max*; siendo esta la primera comunicación sobre la presencia de una Trx h 1 en *S. minima* (Figura5). Considerando que las Trxs h citosólicas han sido relacionadas a la detoxificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y especies reactivas de oxígeno (EROs) (Smiri *et al.*, 2010), resulta factible suponer que las mismas podrían desempeñar un papel importante en la protección de *S. minima* frente al estrés oxidativo inducido por el Cr(VI).



**b**

```

GTGCATATGGCAGGTTTCATCAGAAGAGGGACAAGTTATCAGCTGTCACAGC
GTTGATGCATGGAACGATATCCTTCACAGAGGCAATGAATCCAAGAACTG
ATTGTTGTGGACTTTACTGCTTCTTGGTGTGGACCAAGCCGTTTCATTGCAC
CATTCTTGGTGAATTGGCTAAGAAGTTTACGAATGTCATATTCCTTAAGGT
GGACGTGGACGAACTAAAGTCTGTTGCTCAAGATTGGGCTGTTGAGGCTAT
GCCAACATTTGTGTTTGTGAAAGAAGGAACGATTTTGGGCAAAGTGGTTGG
AGCAAAGAAAGAAGAACTGCAGCAGACGATTGAGAGACATGTGGCTTCATC
TAATGCTTAGGGATCCAC (377 pb)

```

**Figura 5:** Expresión de la Trx h 1 (flecha) en hojas sumergidas de plantas de *S. minima* cultivadas en verano en presencia de 20 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) (a). Secuencia nucleotídica de la Trx h 1 de *S. minima* (b).

El análisis global de los resultados obtenidos nos llevó a postular que en términos estacionales estarían operando diferentes mecanismos de acumulación y tolerancia al Cr(VI) en las plantas de *S. minima*, pero también nos llevó a asumir que el potencial remediador de esta especie depende de la interacción entre la estacionalidad (temperatura) y la toxicidad del metal más que de la propia capacidad acumuladora “*per se*”.

El estudio comparativo entre distintas especies de *Salvinia*, mostró que *S. minima* y *S. rotundifolia* presentan patrones diferentes de acumulación de

biomasa y Cr(VI); así mientras en la primera la acumulación relativa más alta de metal ocurre en las frondes, en la segunda ocurre en las lacinias. Esto indica la existencia de mecanismos diferentes de translocación y/o retención del metal entre ambas especies. La existencia de cambios significativos en el patrón distributivo así como en los niveles de MDA, índice de estabilidad de membrana (IEM), compuestos tiólicos proteicos y no-proteicos así como en los compuestos fenólicos solubles e insolubles, llevaron a postular de que ambas especies toleran el estrés inducido por el Cr(VI) por mecanismos diferentes que incluyen complejamiento y/o reducción del metal y eliminación de EROs. Por otra parte tomando en cuenta la acumulación de metal y la producción de biomasa, *S. rotundifolia* aparece con mayor potencial que *S. minima* para la remoción del Cr(VI) de aguas contaminadas (Prado *et al.*, 2015).

En resumen, nuestros estudios permitieron establecer que antes de emprender cualquier proyecto de fitorremediación de Cr(VI) con posibilidades ciertas de tener éxito, se requiere no sólo una buena selección de la/s macrófita/s a emplear sino también la realización de una serie de estudios que incluyan los aspectos fisiológicos, bioquímicos, metabólicos y su interacción con los factores ambientales y características fisicoquímicas del medio a descontaminar.

## **Agradecimientos**

Esta investigación se financió con los subsidios: G226, G437 y PIUNT 26G/347 del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT), PICTO 898 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT) y PIP11/265 del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

## **Referencias Bibliográficas**

Aldrich MV, Torresdey JLG, Videá JRP, Parsons JG. 2003. Uptake and reduction of Cr(VI) to Cr(III) by mesquite (*Prosopis* spp.): chromate-plant interaction in hydroponics and solid media studied using XAS. *Environ. Sci. Technol.* 37: 1859-1864.

- Ali H, Khan E, Sajad MA. 2013. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere* 91: 869-881.
- Arora A, Saxena S. 2005. Cultivation of *Azolla microphylla* biomass on secondary treated Delhi municipal effluent. *Biomass Bioenergy* 29: 60-64.
- Arora A, Saxena S, Sharma DK. 2006. Tolerance and phytoaccumulation of chromium by three *Azolla* species. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 97-100.
- Ayman A, Jewsbury RA, Hassan AT, Humphreys P, Al-Sayah MH. 2014. Phytoextraction of Cr(VI) from soil using *Portulaca oleracea*. *Toxicol. Environ. Chem.* 95: 1338-1347.
- Barakat MA. 2011. New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. *Arabian J. Chem.* 4: 361-377.
- Bennicelli R, Stepniewska Z, Banach A, Szajnocha K, Ostrowski J. 2004. The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metals (Hg(II), Cr(III), Cr(VI)) from municipal waste water. *Chemosphere* 55: 141-146.
- Chatterjee J, Kumar P, Sharma PN, Tewari RK. 2015. Chromium toxicity induces oxidative stress in turnip. *Indian J. Plant Physiol.* 20: 220-226.
- Chekroun KB, Baghour M. 2013. The role of algae in phytoremediation of heavy metals: A review. *J. Materials Environ. Sci.* 4: 873-880.
- Chocobar Ponce S, Prado C, Pagano E, Prado FE, Rosa M. 2014. Effect of solution pH on the dynamic of biosorption of Cr(VI) by living plants of *Salvinia minima*. *Ecol. Eng.* 74: 43-51.
- Deer WA, Howie RA, Zussman J. 2013. An Introduction to the Rock-Forming Minerals, 3rd ed. London Mineralogical Society, England, pp. 498.
- Dhir B. 2013. Phytoremediation: Role of Aquatic Plants in Environmental Clean-Up. Springer, India, pp. 111.
- Dhir B, Sharmila P, Pardha Saradhi P, Nasim AA. 2009. Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium-rich wastewater. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 1790-1797.
- Duarte B, Silva V, Caçador I. 2012. Hexavalent chromium reduction, uptake and oxidative biomarkers in *Halimione portulacoides*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 83: 1-7.
- Dushenkov V, Kumar NPBA, Motto H, Raskin I. 1995. Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environ. Sci. Technol.* 29: 1239-1245.

- EFSA (European Food Safety Authority). 2014. Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of chromium in food and drinking water. pp, 261. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3595.pdf>
- Espinoza-Quiñones FR, Da Silva EA, de Almeida Rizzutto M, Palácio SM, Módenes AN, Szymanski N, Alexander NM, Kroumov AD. 2008. Chromium ions phytoaccumulation by three floating aquatic macrophytes from a nutrient medium. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 3063-3070.
- Fecht-Christoffers MM, Führs H, Braun HP, Horst WJ. 2006. The role of hydrogen peroxide-producing and hydrogen peroxide-consuming peroxidases in the leaf apoplast of cowpea in manganese tolerance. *Plant Physiol.* 140: 1451-1463.
- Fendorf SE. 1995. Surface reactions of chromium in soils and waters. *Geoderma* 67: 55-71.
- Hassmanova V, Vaneckova J, Bousova K. 2000. Occupational diseases caused by chromium and its compounds. *Acta Medica* 43: 33-36.
- Jeyasingh J, Somasundaram V, Philip L, Bhallamudi SM. 2010. Bioremediation of Cr(VI) contaminated soil/sludge: Experimental studies and development of a management model. *Chem. Eng. J.* 160: 556-564.
- Krejpcio Z. 2001. Essentiality of chromium for human nutrition and health. *Pol. J. Environ. Stud.* 10: 399-404.
- Levina A, Lay PA. 2008. Chemical properties and toxicity of chromium(III). *Chem. Res. Toxicol.* 21: 563-571.
- Madhavi V, Reddy AVB, Reddy KG, Madhavi G, Prasad, TNVKV. 2013. An overview on research trends in remediation of chromium. *Res. J. Rec. Sci.* 2: 71-83.
- Maine MA, Hadad HR, Sánchez G, Caffaratti S, Pedro MC. 2016. Kinetics of Cr(III) and Cr(VI) removal from water by two floating macrophytes. *Int. J. Phytoremediat.* 18: 261-268.
- Marouani N, Tebourbi O, Mokni M, Yacoubi MT, Sakly M, Benkhalifa M, Rhouma KB. 2011. Embryotoxicity and fetotoxicity following intraperitoneal administrations of hexavalent chromium to pregnant rats. *Zygote* 19: 229-235.
- Michalak A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol. J. Environ. Stud.* 15: 523-530.
- Miretzky P, Fernandez Cirelli A. 2010. Cr(VI) and Cr(III) removal from aqueous solution by raw and modified lignocellulosic materials: A review. *J. Hazard. Mater.* 180: 1-19.

- Mishra S, Bharagava RN. 2016. Toxic and genotoxic effects of hexavalent chromium in environment and its bioremediation strategies. *J. Environ. Sci. Health Part C* 34: 1-32.
- Nichols PB, Couch JD, Al-Hamdani SH. 2000. Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations. *Aquat. Bot.* 68: 313-319.
- Oliveira H. 2012. Chromium as an environmental pollutant: insights on induced plant toxicity. *J. Bot.* ID 375843, 8 pp. Doi:10.1155/2012/375843.
- Pati S, Satapathy KB. 2016. Phytoremediation potential of aquatic macrophytes *Azolla pinnata* R. Br. and *Salvinia molesta* Mitchell for removal of chromium from waste water. *Int. J. Sci. Environ. Technol.* 5: 2146-2160.
- Podazza G, Arias M, Prado FE. 2016. Early interconnectivity between metabolic and defense events against oxidative stress induced by cadmium in roots of four citrus rootstocks. *Funct. Plant Biol.* 43: 973-985.
- Prado C. 2011. Respuestas bioquímicas y anatomofisiológicas de *Salvinia minima* al Cromo. Su potencial uso como agente fitorremediador de ambientes contaminados. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales e IML, Universidad Nacional de Tucumán, pp. 141.
- Prado FE, Hilal M, ChocobarPonce S, Pagano E, Rosa M, Prado C. 2015. Chromium and the plant: a dangerous affair?. En: Parvaiz A. (ed.), *Plant Metal Interaction: Emerging Remediation Techniques*. Elsevier, Netherlands, pp. 149-177.
- Prado C, Pagano E, Prado FE, Rosa M. 2012. Detoxification of Cr(VI) in *Salvinia minima* is related to seasonal-induced changes of thiols, phenolics and antioxidative enzymes. *J. Hazard. Mater.* 239-240: 355-361.
- Prado C, Prado FE, Pagano E, Rosa M. 2015. Differential effects of Cr(VI) on the ultrastructure of chloroplast and plasma membrane of *Salvinia minima* growing in summer and winter. Relationships with lipid peroxidation, electrolyte leakage, photosynthetic pigments, and carbohydrates. *Water, Air, Soil Pollut.* 226: 8. Doi: 10.1007/s11270-014-2284-3.
- Prado C, Rodríguez-Montelongo L, González JA, Pagano EA, Hilal M, Prado FE. 2010. Uptake of chromium by *Salvinia minima*: effect on plant growth, leaf respiration and carbohydrate metabolism. *J. Hazard. Mater.* 177: 546-553.
- Prado C, Rosa M, Pagano E, Prado FE. 2013. Metabolic interconnectivity among alternative respiration, residual respiration, carbohydrates and phenolics in leaves of *Salvinia minima* exposed to Cr(VI). *Environ. Exp. Bot.* 87: 32-38.

- Prado C, Rosa M, Pagano E, Hilal M, Prado FE. 2010. Seasonal variability of physiological and biochemical aspects of chromium accumulation in outdoor-grown *Salvinia minima*. *Chemosphere* 81: 584-593.
- Prasad MNV. 2007. Aquatic plants for phytotechnology. En: Singh, S.N., Tripathi, R.D. (eds.), *Environmental Bioremediation Technologies*. Springer-Verlag, Germany, pp. 257-274.
- Rai PK. 2010. Microcosm investigation on phytoremediation of Cr using *Azolla pinnata*. *Int. J. Phytoremediat.* 12: 96-104.
- Saha R, Nandi R, Saha B. 2011. Sources and toxicity of hexavalent chromium. *J. Coord. Chem.* 64: 1782-1806.
- Santana KB, de Almeida AAF, Souza VL, Mangabeira PAO, Silva DC, Gomes FP, Dutruch L, Loguercio LL. 2012. Physiological analysis of *Genipa americana* L. reveals a tree with ability as phytostabilizer and rhizofilterer of chromium ions for phytoremediation of polluted watersheds. *Environ. Exp. Bot.* 80: 35-42.
- Shiny KJ, Remani KN, Jalaja TK, Sasidharan VK. 2004. Removal of chromium by two aquatic pteridophytes. *J. Environ. Sci. Engin.* 46: 249-251.
- Singh HP, Mahajan P, Kaur S, Batish DE, Kohli RK. 2013. Chromium toxicity and tolerance in plants. *Environ. Chem. Letters* 11: 229-254.
- Sinha S, Singh S, Mallick S. 2008. Comparative growth response of two varieties of *Vigna radiata* L. (var. PDM 54 and var. NM 1) grown on different tannery sludge applications: effects of treated wastewater and ground water used for irrigation. *Environ. Geochem. Health* 30: 407-422.
- SitiZubaidah AK, NiK Ismail Azlan AR. 2013. Application of aquatic plants phytoremediators as green technology treatment in polluted urban lakes ecology. *Trans. Advan. Space Res. Earth Explorat.* 1: 1-18.
- Smiri M, Chaoui A, Ferjani EE. 2010. Interaction between heavy metals and thiol-linked redox reactions in germination. *Pakistan J. Biol. Sci.* 13: 877-883.
- Srivastava J, Gupta, A, Chandra H. 2008. Managing water quality with aquatic macrophytes. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7: 255-266.
- Verbinnen B, Billen P, Van Coninckxloo M, Vandecasteele C. 2013. Heating temperature dependence of Cr(III) oxidation in the presence of alkali and alkaline earth salts and subsequent Cr(VI) leaching behavior. *Environ. Sci. Technol.* 47: 5858-5863.
- Vincent JB. 2000. The biochemistry of chromium. *J. Nutri.* 130: 715-718.
- Zayed AM, Terry N. 2003. Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant Soil* 249: 139-156.

- Zeid IM. 2001. Responses of *Phaseolus vulgaris* to chromium and cobalt treatments. *Biol. Plantarum* 44: 111-115.
- Zhao M, Duncan JR. 2010. Batch removal of hexavalent chromium by *Azolla filiculoides*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 26: 179-182.

## **Acerca de los autores**

Dr. FERNANDO EDUARDO PRADO

Dra. MARIANA ROSA

Dra. SILVANA CHOCOBAR PONCE

Dra. CAROLINA PRADO

Facultad de Ciencias Naturales – Instituto Miguel Lillo. CONICET-  
Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina.

Dr. EDUARDO PAGANO

Facultad de Agronomía. Instituto de Investigaciones en Biociencias  
Agrícolas y Ambientales. CONICET- Universidad de Buenos Aires.  
Buenos Aires, Argentina.

## **Acerca del primer autor**

Fernando Eduardo Prado es Doctor en Bioquímica y Profesor Titular de Fisiología Vegetal en la Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo de la Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Actualmente se desempeña como Investigador de la UNT e Investigador Independiente del CONICET; siendo además Investigador Adscrito de la Fundación Miguel Lillo. Ha participado en el dictado de 18 cursos de postgrado en la UNT así como en Universidades de Perú (Universidad Nacional del Altiplano-Puno) y Bolivia (Universidad Mayor de San Andrés-La Paz). Se dedica al estudio de la Fisiología y Bioquímica Vegetal, enfocado al estudio del estrés abiótico en plantas. Dirige investigadores del CONICET como así también numerosas tesis doctorales desarrolladas en la UNT.

# Efecto de contaminantes sobre las macrófitas acuáticas: aplicaciones en la fitorremediación

---

**María de las Mercedes Mufarrege, Gisela Alfonsina Di Luca, Hernán Ricardo Hadad, María Alejandra Maine**

## RESUMEN

Las macrófitas son el principal componente biológico de los ecosistemas acuáticos y se han convertido en una cuestión central no sólo en estrategias de conservación de humedales naturales sino en la optimización de la eficiencia de humedales construidos. En humedales construidos para mejorar la calidad de agua es necesario utilizar macrófitas nativas que presenten alta tolerancia y eficiencia de remoción de los contaminantes a eliminar. Se estudió un humedal construido para el tratamiento de efluentes de una industria metalúrgica, donde se trasplantaron 12 especies de macrófitas (emergentes y flotantes) de la zona. Después de un período la especie emergente *Typha domingensis* cubrió el humedal. Para poder determinar porque *T. domingensis* logró su dominancia, se realizaron experimentos de invernadero. Se evaluó la respuesta de dos poblaciones de *T. domingensis* (plantas extraídas del humedal construido y de humedales naturales) a condiciones extremas de pH y/o salinidad, observándose que las plantas provenientes del humedal construido adaptaron su morfología y fisiología para tolerar estas condiciones, mientras que las plantas provenientes de los humedales naturales no las toleraron. En otras experiencias se comprobó la eficiente capacidad de acumulación de diferentes metales y alta tolerancia a los mismos, observándose que la presencia de nutrientes favoreció la tolerancia de la macrófita *T. domingensis* demostró una elevada tolerancia al ser expuesta a condiciones ambientales perjudiciales, modificando su morfología y fisiología, con el fin de proteger aquellos tejidos que le permiten reproducirse y realizar el proceso de fotosíntesis.

**Palabras claves:** fitorremediación, macrófitas acuáticas, tolerancia, morfología

## Introducción

En los últimos años, la utilización de humedales de tratamiento de efluentes se expandió por todo el mundo, siendo sistemas complejos (Vymazal, 2007, 2013; Headley y Tanner, 2012; Fonder y Headley, 2013; Maine *et al.*, 2013, 2017; Rossmann *et al.*, 2013; Sukuman, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Verlicchi y Zambello, 2014). Los humedales de tratamiento son sistemas biológicos que cambian a lo largo del tiempo de acuerdo a los ciclos biológicos, la competencia entre las diferentes especies de plantas, las variaciones ambientales y los fenómenos naturales (lluvia, estaciones naturales, pastoreo, etc.). Las macrófitas son el principal componente biológico de los humedales de tratamiento ya que no sólo asimilan los contaminantes directamente en sus tejidos, sino que además influyen en la biogeoquímica de los sedimentos, actúan como un catalizador para las reacciones de purificación aumentando la diversidad del ambiente en la zona de las raíces favoreciendo diversas reacciones químicas y bioquímicas que mejoran la purificación (Jenssen *et al.*, 1993). Por esta razón, se han convertido en una cuestión central no sólo en estrategias de conservación y optimización de la eficiencia de humedales construidos. Determinar la tolerancia de las plantas a las condiciones del efluente a tratar (pH, salinidad, concentración de contaminantes), la eficiencia de depuración en diferentes diseños de humedales y las especies vegetales a utilizar, es un punto clave para optimizar el funcionamiento de estos ecosistemas construidos (Wu *et al.*, 2015).

*Typha domingensis* es una especie monocotiledónea perteneciente a la Familia *Typhaceae*. Es una hierba perenne, rizomatosa, con hojas de láminas lineares y acintadas (Dimitri, 1977). Muestra un rápido crecimiento y elevada biomasa y, por lo tanto, posee una elevada capacidad competitiva frente a otras especies de macrófitas emergentes. Presenta una amplia distribución mundial y una elevada tolerancia a diversos contaminantes, por lo que es ampliamente utilizada en humedales naturales y construidos para el tratamiento de diversos efluentes (Fediuc *et al.*, 2005; Maine *et al.*, 2009; Kadlec y Wallace, 2009; Hegazy *et al.*, 2011; Dordio *et al.*, 2011).

En Santo Tomé, Santa Fe (Argentina), en el año 2002, una empresa metalúrgica construyó un humedal para el tratamiento de sus efluentes, los cuales presentan alto pH y salinidad y contienen Cr, Ni, Zn (efluente industrial), P y N (efluente cloacal). El humedal es de flujo superficial y se ha estudiado desde que comenzó a operar. Los detalles del diseño pueden consultarse en Maine *et al.*, (2006). Inicialmente en el humedal se trasplantaron 12 especies de macrófitas tanto flotantes como arraigadas. En dicho humedal se observaron dos etapas marcadas de dominancia vegetal. En la primera etapa, las macrófitas flotantes fueron las dominantes durante un año, luego su cobertura disminuyó hasta desaparecer. En la segunda etapa, la especie emergente *T. domingensis* se convirtió en la dominante. El humedal demostró ser muy eficiente en la retención de contaminantes en ambas etapas (Maine *et al.*, 2006). Dicho humedal sigue funcionando en la actualidad con una alta eficiencia. Por lo antedicho, el objetivo del trabajo fue estudiar la tolerancia de *T. domingensis* a las condiciones del sistema y su eficiencia en la retención de los contaminantes. Se realizaron experimentos de invernadero, donde se evaluó su respuesta al ser expuesta a condiciones extremas de pH y/o salinidad y a diferentes concentraciones de metales con y sin agregado de nutrientes.

## **Respuestas de plantas de *Typha domingensis* a elevados pH y salinidad**

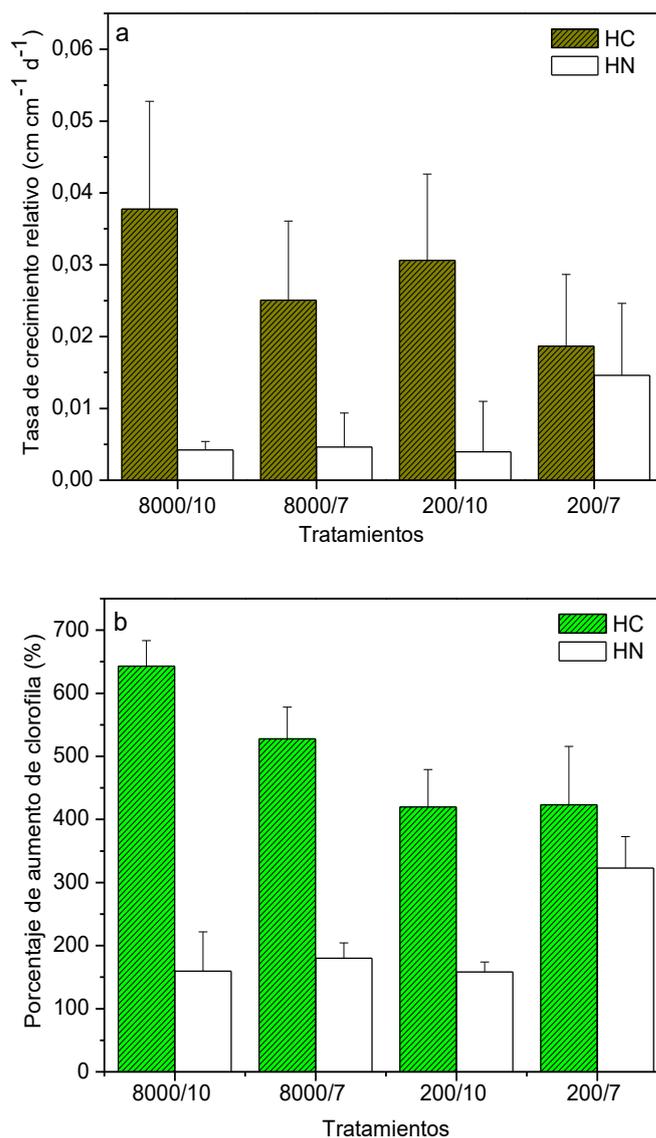
### ***Recolección de las plantas y diseño experimental***

Este experimento fue realizado para comparar la adaptabilidad de plantas de *T. domingensis* provenientes de un humedal construido a las condiciones de pH y salinidad de un humedal natural y la adaptabilidad plantas provenientes de un humedal natural expuestas a condiciones de alto pH y salinidad, similares a las encontradas en un humedal construido. Plantas en buenas condiciones y de similar altura fueron seleccionadas de un humedal construido (HC) y de un humedal natural (HN). El HC es de flujo superficial (31° 40' 66" S; 60° 47' 80" O) el cual tiene un área de 2000 m<sup>2</sup> y una profundidad aproximada de 0,4-0,7 m con un tiempo de residencia hidráulica estimado entre

7-12 días. El HN está localizado en un ambiente natural no contaminado perteneciente a la llanura de inundación del Río Paraná, cercano a la ciudad de Santa Fe (S 31° 38' 41", O 60° 39' 51"). Se utilizaron reactores plásticos de 10 L de capacidad en donde se colocaron dos plantas y sedimento. La composición química del sedimento fue: pH: 7,67; Cr: 0,015 mg g<sup>-1</sup>; Ni: 0,006 mg g<sup>-1</sup>; Zn: 0,13 mg g<sup>-1</sup>; PT (fósforo total): 0,57 mg g<sup>-1</sup>; Nitrógeno Total Kjeldahl (NTK): 1,32 mg g<sup>-1</sup>. Las plantas se aclimataron durante 10 días bajo fotoperiodo natural (12 hs luz:12 hs oscuridad). Luego de la aclimatación, las plantas fueron cortadas a una altura de 19 cm aproximadamente. Al inicio del experimento se agregaron a cada reactor tres litros de las soluciones con distintos valores de salinidad y pH. Los diferentes valores de salinidad fueron alcanzadas adicionando sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Esta sal fue elegida debido a que Na<sup>+</sup> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> son los iones mayoritarios tratados en el efluente del HC estudiado. Los valores de pH se mantuvieron utilizando soluciones buffer. Los valores de pH y salinidad estudiados fueron los que se midieron en los distintos muestreos llevados a cabo en el HC y en los HN de la zona. Los tratamientos de salinidad (mg l<sup>-1</sup>)/pH aplicados a las plantas del HC y del HN fueron: 8000/10 (valores encontrados en el HC); 8000/7; 200/10 y 200/7 (valores encontrados en el HN). El experimento duró 90 días y se realizó por triplicado. A lo largo del experimento, se observó la apariencia externa de las plantas con el fin de detectar posibles signos de senescencia. Periódicamente, se midió la altura de plantas y se calculó la tasa de crecimiento relativo, de acuerdo a la ecuación de Hunt, (1978). Al inicio y al finalizar el experimento se midió la concentración de clorofila, la cual fue expresada como porcentaje de aumento de clorofila. Al finalizar el experimento se realizaron cortes de raíces y hojas para ser analizados por microanálisis de rayos X con microscopio electrónico de barrido (MEB).

### ***Respuestas de las plantas a elevados pH y salinidad***

En comparación con las plantas del HN, las mayores tasas de crecimiento y porcentajes de aumento de clorofila fueron observados en las plantas del HC (Figuras 1a y 1b).



**Figura 1:** Tasa de crecimiento relativo (a) y porcentaje de aumento de la clorofila (%) de *T. domingensis* (b). Media  $\pm$  desviación estándar. HC: Humedal construido; HN: Humedal natural. Tomado de Mufarrege *et al.* (2011).

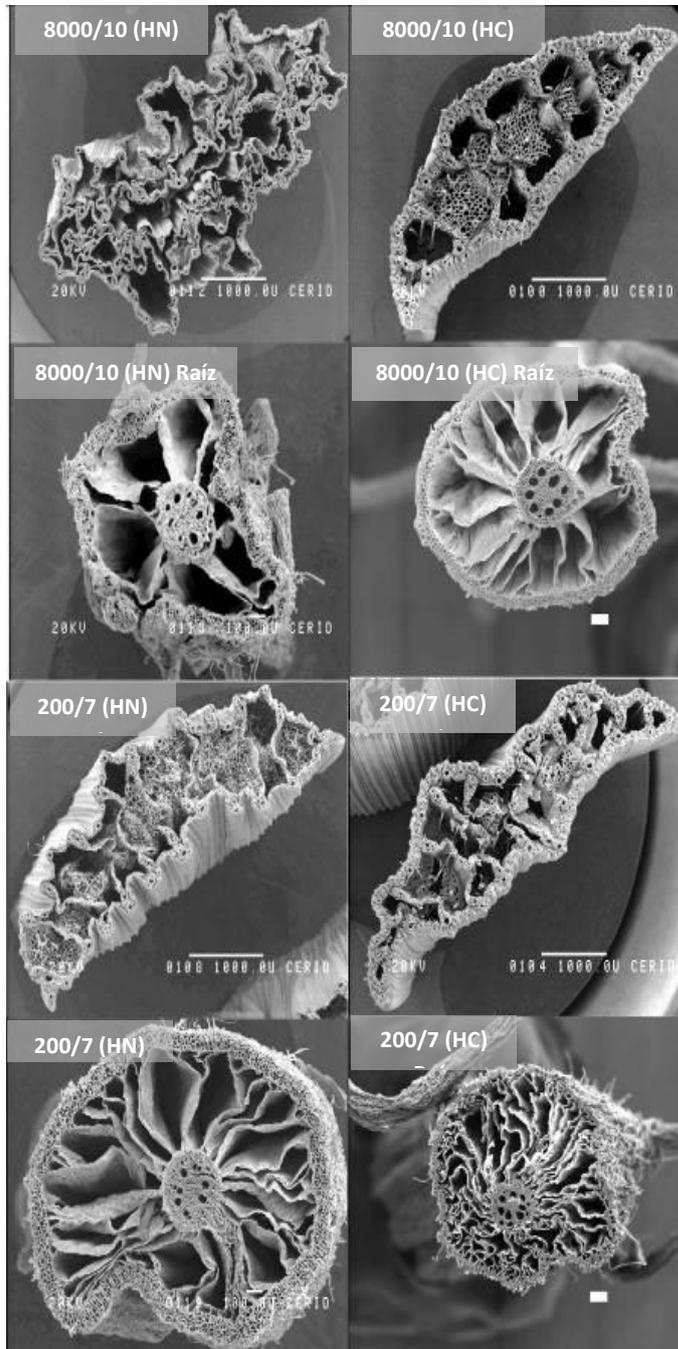
Las plantas del HC debido a que están permanentemente expuestas a las condiciones presentes en el efluente industrial modificaron no solo su fisiología, sino también su morfología con el fin de adaptarse y tolerar las condiciones extremas de pH y salinidad estudiadas en este trabajo. En las plantas del HN, las mayores tasas de crecimiento y aumento de clorofila fueron observados en los tratamientos 200/7, probablemente debido a que este

tratamiento presenta los valores normales de salinidad y pH del agua del HN. Los efectos de la salinidad encontrados en las plantas del HN fueron coincidentes con los reportados por Nilratnisakorn *et al.* (2007), quienes observaron que la tasa de crecimiento de *T. angustifolia* fue afectada por efluentes con alta salinidad provenientes de una fábrica de tinturas sintéticas. Estos autores, encontraron que la inhibición de la fotosíntesis fue debido a la precipitación de cristales de sal de sodio en hojas y raíces que causan la obstrucción del transporte de solutos. Por otra parte, Macek y Rejmánková (2007), encontraron que el crecimiento vertical y horizontal de plantas de *T. domingensis* fue limitado por la alta salinidad. Glenn *et al.* (1995) observaron que a una concentración de 9 ppt de NaCl, la altura y el número de nuevos tallos de *T. domingensis* presentaron un decrecimiento significativo.

La estructura de las raíces de las plantas del HC fue modificada por la salinidad, mientras que el pH no produjo cambios. Por otro lado, el pH y la salinidad produjeron cambios en la estructura de las raíces de las plantas de HN (Figura 2). En el caso de macrófitas flotantes libres, Hadad *et al.*, (2006) encontraron que un valor de pH = 10 fue tóxico para el crecimiento de *S. herzogii*, *P. stratiotes* y *E. crassipes*. Estos autores observaron una tasa de crecimiento negativa en *E. crassipes* a una conductividad de 4000  $\mu\text{mho cm}^{-1}$ . Estos autores estudiaron valores de pH similares a los utilizados en nuestro experimento, mientras que los valores de salinidad fueron menores, lo que indica una mayor tolerancia de *T. domingensis* en comparación con las macrófitas flotantes estudiadas. Las plantas emergentes son más tolerantes a condiciones extremas de salinidad y pH que las macrófitas flotantes, ya que el sedimento actúa como una barrera que equilibra el sistema iónicamente.

Las observaciones realizadas por microscopía electrónica permitieron determinar que los tejidos de las plantas del HC se encontraban en buenas condiciones, excepto en el tratamiento 200/7, en el cual, los tejidos foliares y radiculares no se encontraron claramente diferenciados. Estas observaciones confirman la adaptación adquirida por las plantas del HC (Figura 2). Nilratnisakorn *et al.*, (2007) observaron en imágenes de microscopio electrónico de barrido que las raíces de *T. angustifolia* fueron dañadas después de ser sometidas a un efluente provenientes de una industria textil, donde el sodio

cristalino fue depositado en las células de las raíces causando un decrecimiento de la tasa de evaporación y transpiración.



**Figura 2:** Imágenes transversales de hojas y raíces de plantas de HC y HN obtenidas en cada tratamiento bajo SEM-EDX con energía de 20 kV. Tomado de Mufarrega *et al.* (2011).

En las plantas del HN del tratamiento de 8000/10, los tejidos radiculares y foliares no se diferenciaron claramente, mostrando daños severos y deshidratación, mientras que en el tratamiento 200/7 las plantas se encontraban en condiciones normales.

De acuerdo con el microanálisis de rayos X, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los contenidos de Si (sílice) en los tejidos de las plantas provenientes del HC y HN. Debido a la alta abundancia relativa del Si, éste fue eliminado de la tabla del microanálisis de rayos X para que no enmascare la abundancia de los demás elementos encontrados (Tabla 1). En todos los tratamientos, Na, S, Cl, K y Ca presentaron las mayores proporciones en los tejidos de las plantas.

En plantas del HC, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el sodio de las hojas de los tratamientos 8000/10 y 200/7, indicando que este elemento no fue transportado a dichos órganos. La baja concentración de sodio en la médula indica la menor movilidad en las plantas del HN. Los mayores valores de azufre encontrados en la médula indicaron su transporte hacia las partes aéreas. La acumulación de sodio en las raíces de las plantas del HC indica un mecanismo de protección que poseen las plantas para evitar daños en los tallos y para el balance de la presión osmótica (Amarante *et al.*, 2006; Munns y Greenway 1980; Parida y Das 2005; Thomson 1975).

En plantas del HN la médula radicular, presentó altos valores de sodio indicando el transporte de raíces a hojas. Coincidiendo con nuestros resultados, Nilratnisakorn *et al.*, (2007) encontraron que la acumulación de sodio en hojas causó obstrucción del transporte de soluto, el cual produjo la inhibición de la fotosíntesis en las hojas.

En cuanto a la apariencia externa de las plantas, en los tratamientos 8000/7 y 8000/10 se observó deshidratación y presencia de sal adherida a la epidermis de las hojas de las plantas provenientes del HN (Figura 3). Esto no fue observado en las plantas provenientes del HC.

**Tabla 1:** Proporción relativa en % (p/p) de las hojas y raíces de microanálisis de rayos X en los diferentes tratamientos de salinidad (mg L<sup>-1</sup>) y pH (<1 representa los valores por debajo del límite de detección). Tomado de Mufarrege *et al.* (2011).

Tejido	Tratamiento	Zona	Na	Mg	Al	P	S	Cl	K	Ca	Mn	Fe	Ti
Hoja	HC (8000/pH10)	Adaxial	3	1	1	<1	18	20	37	19	<1	<1	<1
		Mesófilo	3	2	<1	1	14	25	33	21	<1	<1	<1
		Abaxial	2	1	1	1	20	14	36	21	1	1	<1
	HN (8000/pH10)	Adaxial	3	1	1	<1	18	20	37	19	<1	<1	<1
		Mesófilo	3	2	<1	1	14	25	33	21	<1	<1	<1
		Abaxial	2	1	1	1	20	14	36	21	1	1	<1
	HC (200/pH7)	Adaxial	2	3	1	3	15	26	19	28	<1	<1	<1
		Mesófilo	6	8	9	1	7	33	17	17	<1	<1	<1
		Abaxial	1	4	1	2	14	27	18	29	<1	1	<1
	HN (200/pH7)	Adaxial	<1	3	<1	3	10	11	51	20	1	<1	<1
		Mesófilo	<1	2	<1	4	5	23	57	7	2	<1	<1
		Abaxial	1	5	1	5	5	15	43	20	2	1	<1
Raíz	HC (8000/pH10)	Epidermis	14	3	3	2	18	2	8	29	<1	9	1
		Parénquima	27	9	6	2	15	5	8	8	<1	5	2
		Médula	1	<1	<1	<1	33	9	22	25	<1	5	<1
	HN (8000/pH10)	Epidermis	16	2	2	3	32	3	19	14	<1	1	<1
		Parénquima	20	2	1	2	37	3	19	14	<1	<1	<1
		Médula	22	2	<1	7	37	6	4	20	1	<1	<1
	HC (200/pH7)	Epidermis	9	2	10	1	3	3	31	8	<1	3	1
		Parénquima	15	2	<1	2	2	3	56	18	<1	<1	<1
		Médula	2	2	<1	4	2	5	54	21	<1	<1	<1
	HN (200/pH7)	Epidermis	<1	3	2	6	2	<1	42	31	<1	9	<1
		Parénquima	<1	4	5	5	1	1	47	21	<1	2	<1
		Médula	<1	3	1	5	3	<1	63	15	<1	1	<1



**Figura 3:** Fotografía de la sal adherida a la epidermis de las hojas de plantas provenientes de un humedal natural. Tomado de Mufarrege *et al.* (2011).

La excreción de sal es una manera eficiente de prevenir concentraciones excesivas en los tejidos fotosintéticos. Estos mecanismos son típicos de especies que tienden a desarrollar características especiales localizadas mayormente en la epidermis de las hojas, conocidos como glándulas de sal o pelos. Sin embargo, *T. domingensis* no posee ninguna de estas estructuras y las secreciones salinas observadas en la superficie de la hoja, fueron probablemente debido a la precipitación cuando el nivel del agua en el acuario decreció por evapotranspiración.

De acuerdo a los resultados, podemos concluir que las plantas del HC tienen adaptaciones fisiológicas y morfológicas para tolerar altos pH y salinidad. Contrariamente, ellas mostraron estrés cuando fueron expuestas a condiciones de pH y salinidad que son generalmente encontradas en aguas del HN (tratamiento 200/7). Las adaptaciones de las plantas del HC fueron demostradas por la mayor tasa de crecimiento relativo y el incremento de la clorofila en comparación con los obtenidos en las plantas del HN. Por otro lado, las plantas del HN mostraron estrés cuando ellas fueron expuestas a altas condiciones de pH y salinidad, normalmente encontradas en un HC. Estos

resultados demuestran que es necesaria una adecuada aclimatación para favorecer la adaptabilidad y la tolerancia de *T. domingensis* a las condiciones del efluente presentes en el wetland. Aunque *T. domingensis* no es una especie halófila y no posee estructuras anatómicas para tolerar y excretar sales, es capaz de modificar su morfología para adaptarse a condiciones extremas, como la exposición a un efluente industrial.

## **Estudio de la tolerancia y eficiencia de acumulación de metales de *T. domingensis***

### ***Recolección de las plantas y diseño experimental***

Debido a que en el humedal construido estudiado se tratan de manera conjunta efluentes industriales (Cr, Ni y Zn) y cloacales (P y N), se realizaron experimentos en invernadero para poder evaluar la tolerancia, las respuestas morfológicas y la distribución a lo largo del tiempo de altas concentraciones de metales en raíces, rizomas, parte aérea de hojas y partes sumergidas de hojas (en contacto con la solución) de plantas de *T. domingensis*. Para ello se utilizaron altas concentraciones de metales y nutrientes (Cr (III), Ni (II), Zn (II), P y N) agregados de manera conjunta y separada.

Para llevar a cabo estos experimentos se recolectaron plantas de ambientes naturales no contaminados ubicados en la llanura de inundación del Río Paraná Medio, las cuales fueron plantadas en reactores plásticos conteniendo 4 Kg de sedimento. Los tratamientos fueron dispuestos por triplicado. Luego de aproximadamente 15 días de aclimatación las plantas fueron podadas a una altura de 19 cm. A cada reactor se le agregó 5 L de soluciones de metales y nutrientes, preparada con agua del sitio de muestreo. Cada muestreo consistió en la extracción de agua, sedimento y plantas para su análisis, por lo tanto, cada reactor fue desechado en cada muestreo. Se midió la altura de plantas, la cual en los resultados se expresaron como tasa de crecimiento relativo, la concentración de clorofila (la cual fue expresado como porcentaje de aumento de clorofila) y la concentración de metales en agua, tejidos vegetales (hojas, raíces y rizomas) y sedimento. Al finalizar el

experimento se analizaron en microscopio óptico 30 secciones transversales de raíces en el muestreo final y en el control. Las raíces principales se tomaron al azar y se cortaron transversalmente a mano alzada siguiendo la técnica propuesta por D'Ambrogio de Argüeso (1986). Los cortes transversales de raíz se colorearon con azul de anilina (azul de algodón), que tiñe de azul las paredes celulósicas. Por otra parte, se extrajeron muestras de tejidos vegetales para ser analizados por microscopía electrónica de barrido (MEB).

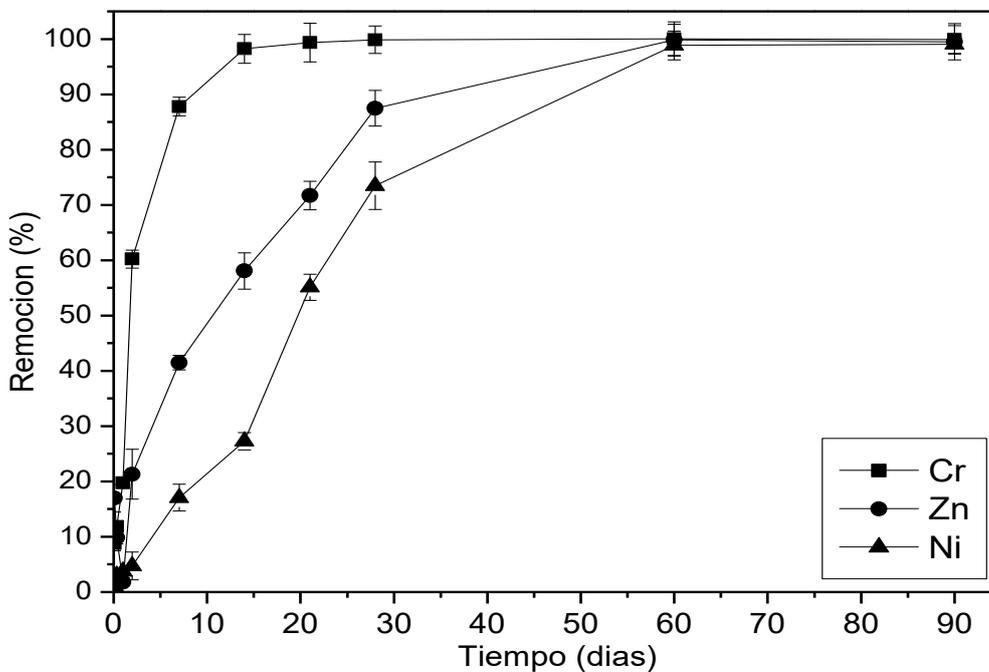
### ***Distribución de Cr, Ni y Zn en tejidos de T. domingensis en el tiempo***

El objetivo de este experimento fue evaluar no sólo la tolerancia sino también la dinámica de los metales en el sistema (agua-planta-sedimento). Para llevar a cabo dicho objetivo, se preparó una solución combinando los metales de la siguiente manera:  $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cr} + 100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni} + 100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}$ .

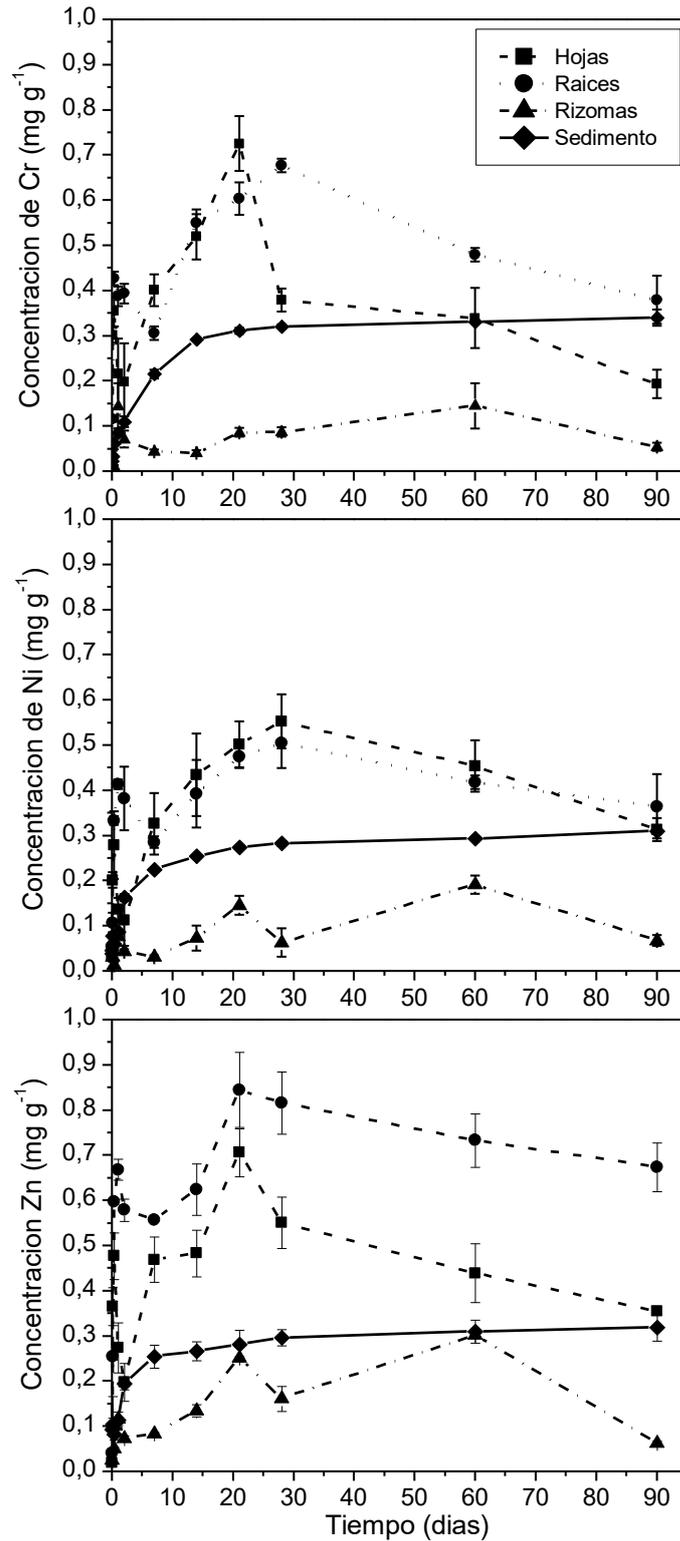
Aunque los tres metales alcanzaron similares remociones finales en agua, el Cr presentó mayor velocidad de remoción que los otros metales (Figura 4). Similares resultados fueron informados para las macrófitas flotantes *P. stratiotes* y *S. herzogii*, las cuales mostraron eficiencias de 98-99% después de 30 días de experimentación utilizando diferentes concentraciones de Cr (Maine *et al.*, 2004; Suñé *et al.*, 2007). Estos autores propusieron que la remoción se debió a que la sorción de Cr(III) es probablemente un mecanismo competitivo-consecutivo con etapas de reacción reversibles.

Las concentraciones de metales observadas en los tejidos aéreos durante los primeros días de exposición puede deberse no sólo a la translocación sino también a la sorción en las partes sumergidas de las hojas en contacto directo con el agua (Figura 5). Los metales pueden ser tomados del sedimento por las raíces de las plantas o por la parte sumergida de las hojas que están en contacto directo con la solución (Mufarrege *et al.*, 2015). La mayoría de las investigaciones han informado que las concentraciones de metales en las raíces son mayores que en las hojas (Hadad *et al.*, 2007; 2011;

Kadlec y Wallace, 2009; Mufarrege *et al.*, 2010; Nilratnisakorn *et al.*, 2007; Vymazal, 2011). Greger (1999) observó que la translocación del metal puede ocurrir en el floema vía apoplasto y luego a través del xilema, de forma acropetálica. Sin embargo, en nuestro experimento, *T. domingensis* mostró elevadas concentraciones de metales en las hojas que no serían compatibles con lo observado por otros autores. Posteriormente, los tres metales mostraron una mayor concentración en hojas, distinguiéndose una etapa de translocación de metales desde raíces hacia partes aéreas. Sin embargo, el Cr y el Zn a los 60 y 90 días mostraron una nueva translocación pero en sentido inverso, desde partes aéreas hacia raíces.



**Figura 4:** Porcentaje de remoción de Cr, Ni y Zn del agua a lo largo del tiempo. Tomado de Mufarrege *et al.* (2014).

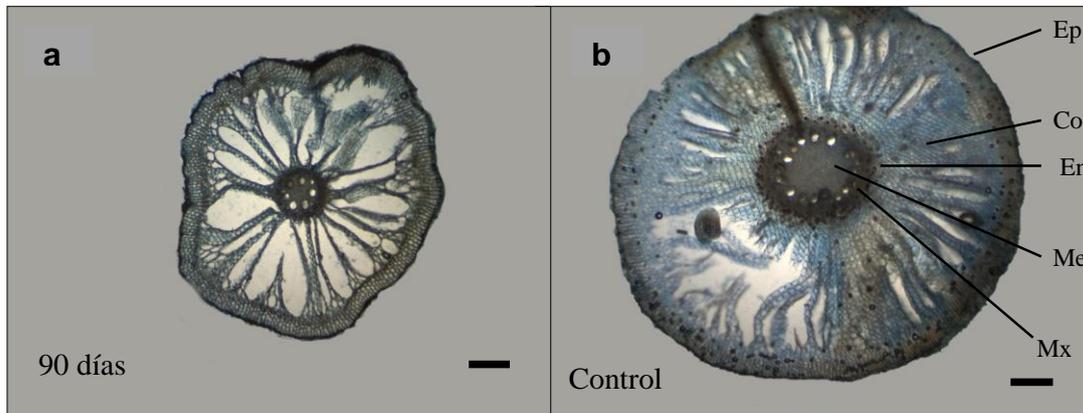


**Figura 5:** Concentraciones de Cr, Ni y Zn en tejidos vegetales (hojas, raíces y rizomas) determinadas a lo largo del experimento. Las barras representan desviaciones estándar. Tomado de Mufarrege *et al.* (2014).

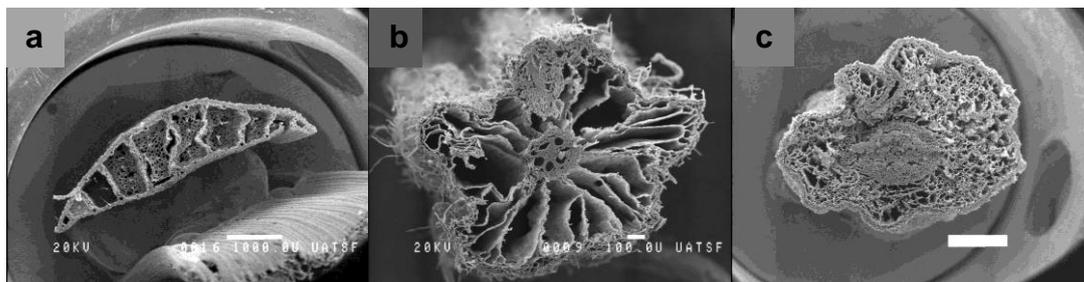
Probablemente, debido a las elevadas concentraciones de metales utilizadas, los sitios de sorción de raíces se saturaron durante los primeros 7 días de experimentación y se produjo la translocación hacia partes aéreas. Luego, a los 60 días, los sitios de acumulación en las partes aéreas se saturaron y los metales se translocaron hacia las raíces nuevamente. De acuerdo a estos resultados, podemos hipotetizar que las plantas translocan de forma alternada los metales, como un mecanismo de protección de los tejidos de órganos funcionalmente activos (hojas y raíces) para que continúen realizando sus funciones vitales sin ser afectadas por la toxicidad de estos contaminantes. Cabe aclarar que estos resultados fueron observados cuando se sometió a *T. domingensis* a elevadas concentraciones de metales y que estas condiciones no se observan en humedales naturales ni construidos para el tratamiento de efluentes industriales.

El sedimento fue el principal compartimento para la acumulación de los metales, lo que ya reportamos previamente (Maine *et al.*, 2007, 2009). Por otra parte, cuando las plantas disminuyen su eficiencia en la retención de contaminantes, el sedimento aumenta su capacidad de retención, manteniendo así la eficiencia de eliminación de contaminantes del sistema por un lapso acotado de tiempo. (Maine *et al.*, 2013; Panigatti y Maine, 2003). Las macrófitas son componentes imprescindibles para el funcionamiento de estos sistemas ya que están involucradas en la biogeoquímica de los sedimentos a través del transporte de oxígeno de las partes aéreas a la rizósfera, modificando la dinámica de los contaminantes, como ejemplo aumentando la acumulación de metales en los sedimentos (Sundby *et al.*, 2005). La acumulación de metales en las macrófitas se acompaña frecuentemente de modificaciones celulares que pueden contribuir a la tolerancia del metal (Prasad y Freitas, 2003). En nuestro trabajo, *T. domingensis* disminuyó los parámetros morfométricos de la raíz debido a concentraciones de metal extremadamente altas (Figura 6). En los análisis de MEB se puede observar el estado de los tejidos de hojas, raíces y rizomas, al finalizar la experiencia (Figura 7).

A pesar de los efectos subletales registrados, *T. domingensis*, demostró que podía absorber eficientemente Cr, Ni y Zn y sobrevivir en cuerpos de agua contaminados debido a la plasticidad morfológica del sistema radicular.



**Figura 6:** Imágenes de microscopía óptica de las secciones transversales de raíces de *T. domingensis* sometida a tratamientos de Cr, Ni, Zn a los 90 días (a) y el tratamiento control (b). Ep= epidermis, Co= cortex, En= endodermis, Me= médula y Mx= vasos metaxilemáticos. Barra= 650 µm. Tomado de Mufarrege *et al.* (2014).



**Figura 7:** Imágenes de los cortes trasversales de tejidos de hoja (a), raíz (b) y rizoma (c), obtenidos a los 90 días bajo SEM-EDAX con energía 20kV en plantas de *T. domingensis*. Barra= 100 µm.

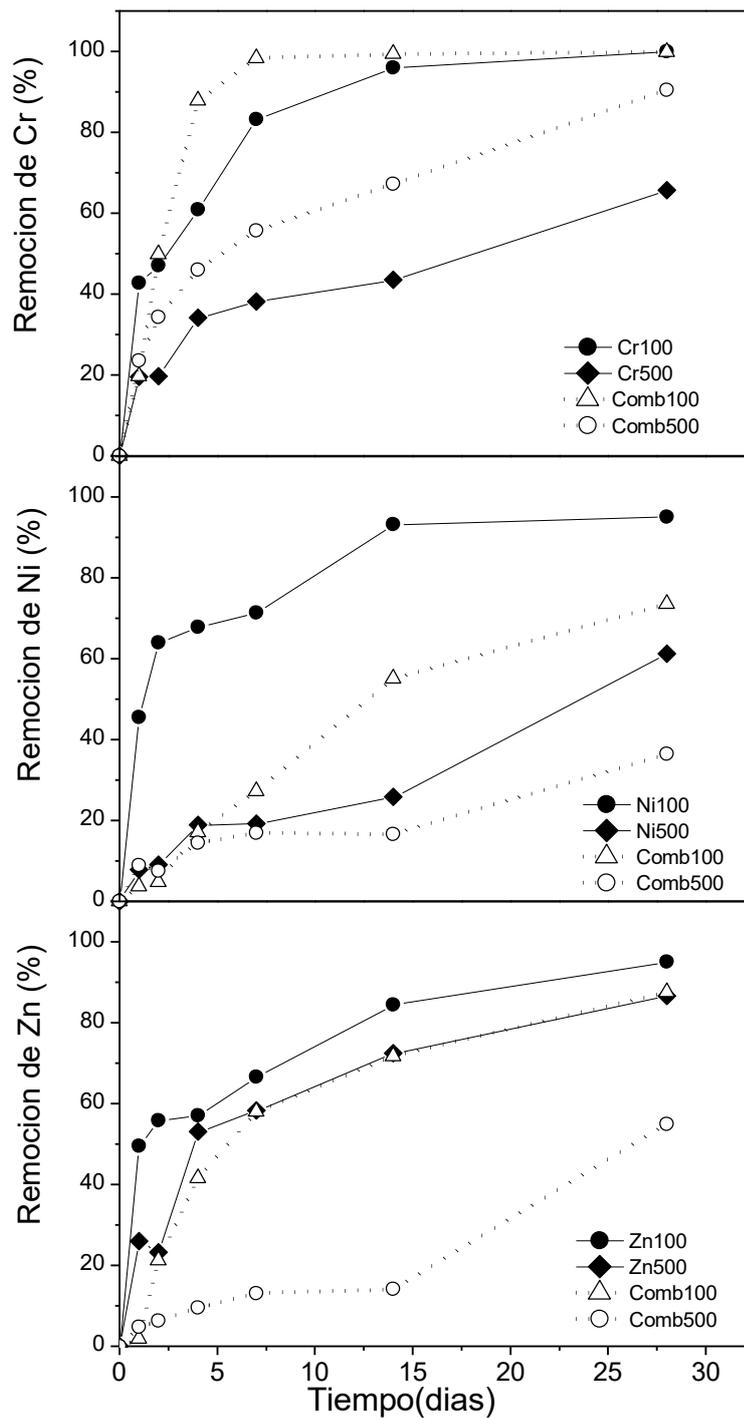
### ***Capacidad de *T. domingensis* para acumular y tolerar altas concentraciones de Cr, Ni y Zn.***

En este experimento las concentraciones de metales fueron aún más altas. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: 100 y 500 mg L<sup>-1</sup> de Cr, Ni y Zn (solución de metales colocadas de manera individual (Cr100), (Cr500), (Ni 100), (Ni500), (Zn100), (Zn500); 100 mg L<sup>-1</sup>Cr + Ni + Zn (solución de metales combinadas (Comb100) y 500 mg L<sup>-1</sup> Cr + Ni + Zn (solución de metales combinadas, (Comb500).

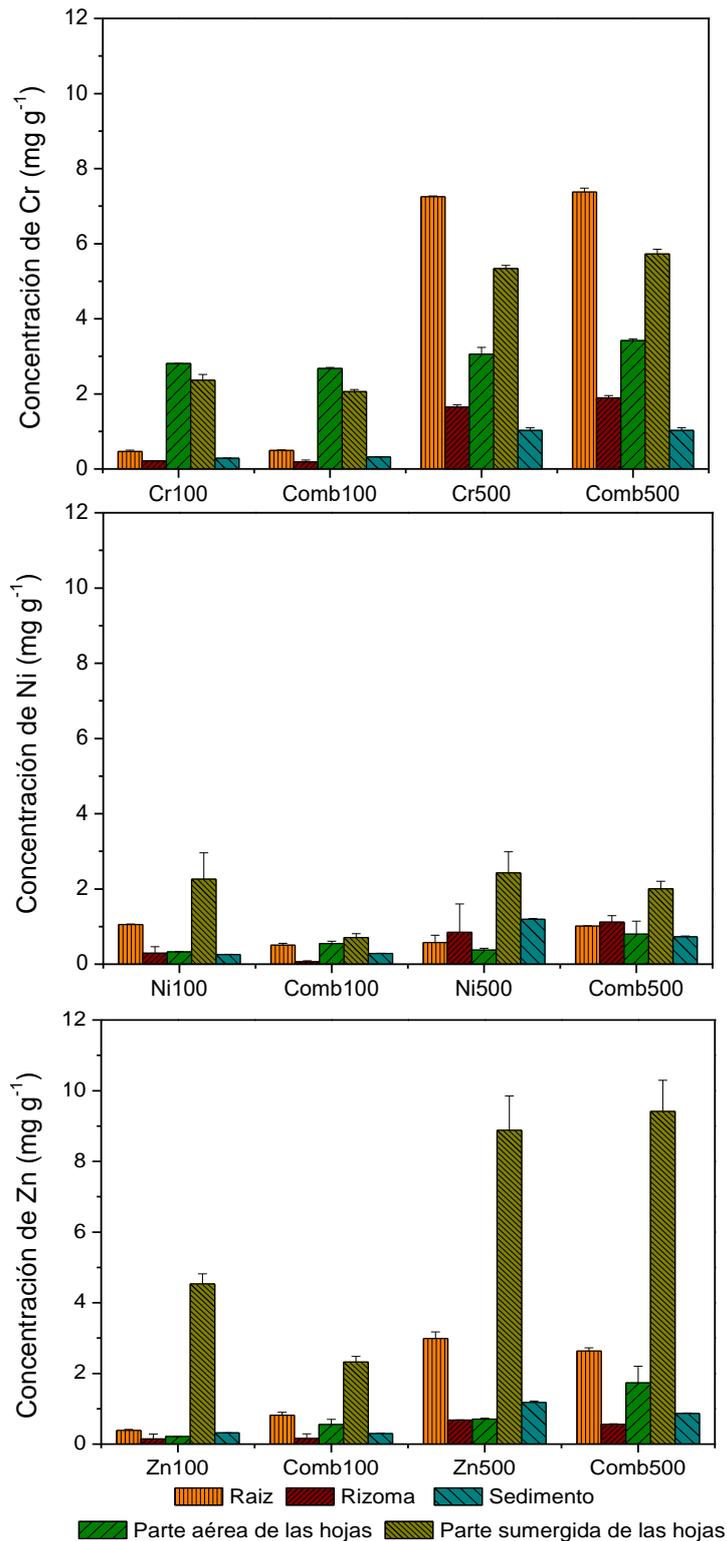
La concentración de los metales en agua disminuyó en todos los tratamientos a lo largo del tiempo (Figura 8). La remoción de Cr fue mayor en el tratamiento de Comb100 que en Cr100 durante todos los muestreos. Lo mismo pudo observarse en el tratamiento de Comb500 la cual presentó mayor porcentaje de remoción que el Cr500. Estos resultados indican que la presencia de Ni y Zn favorece la remoción de Cr.

Para el Ni y Zn las mayores porcentajes de remociones fueron registradas en el tratamiento de 100 mg L<sup>-1</sup> Ni o Zn durante todo el experimento. Para estos metales las menores remociones fueron observadas en el tratamiento Comb500. Contrariamente al Cr, la presencia de otros metales no favorece la remoción de Ni y Zn del agua.

En la Figura 9 se observa que la concentración de metales en sedimentos es menor que en los tejidos. Es importante remarcar, que el transporte de Cr a las partes aéreas fue favorecido por la presencia de Ni y Zn en todos los casos. En los tratamientos de Cr500 y Comb500, la raíz fue el órgano que presentó mayor concentración, seguida por las partes sumergidas de las hojas. Sin embargo, las mayores concentraciones de Ni y Zn en tejidos fueron encontrados en las partes sumergidas de las hojas en todos los tratamientos, esto probablemente pudo deberse a que estos tejidos estaban en contacto directo con la solución. Lo mismo fue observado en los tratamientos de Cr100 y Comb100. El Zn, presentó mayores concentraciones en las partes sumergidas de las hojas que los otros metales estudiados.



**Figura 8:** Porcentaje de remoción de Cr, Ni y Zn del agua a lo largo del tiempo. Tomado de Mufarrege *et al.* (2015).



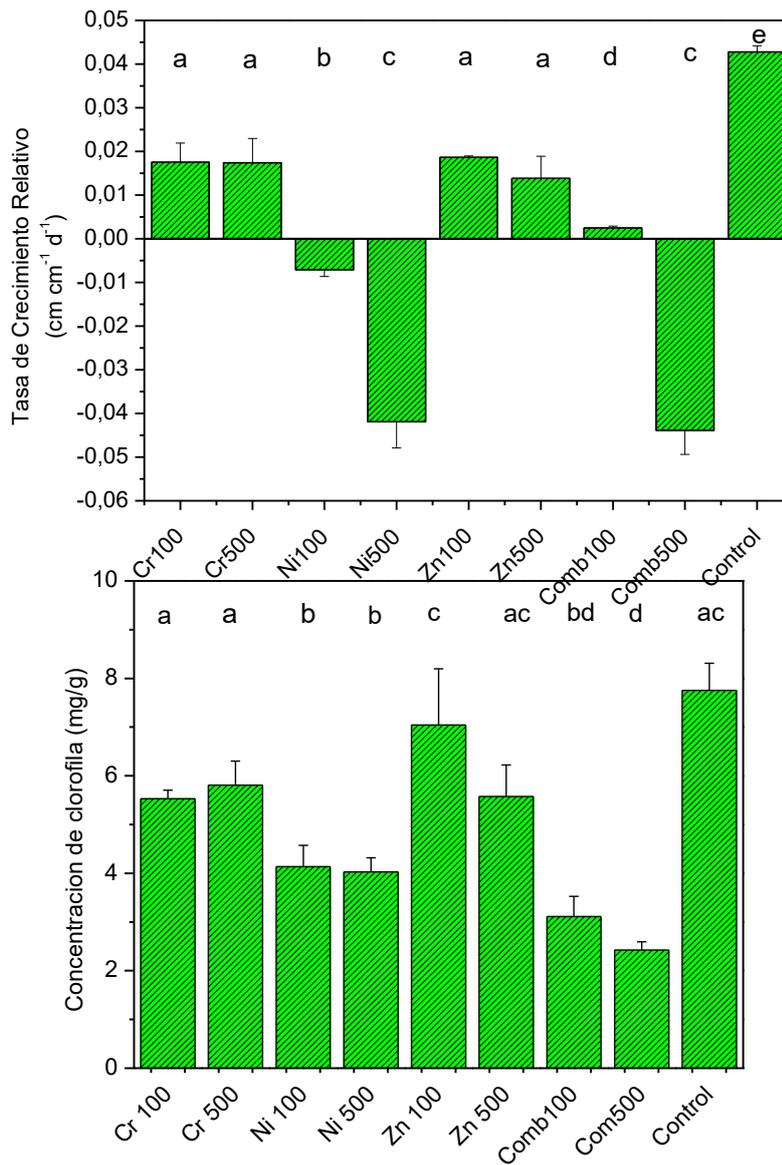
**Figura 9:** Concentraciones finales de Cr, Ni y Zn (mg g<sup>-1</sup>) en raíces, rizomas, partes aéreas de hojas, partes sumergidas de hojas de *T. domingensis* y sedimentos. Las barras representan desviaciones estándar. Tomado de Mufarrege *et al.* (2015).

En cuanto a la tasa de crecimiento relativo, se observó que fue positiva en los tratamientos de Cr, Zn y Comb100, siendo significativamente menores que las obtenidas en el control (Figura 10a). En los tratamientos con Ni y Comb500, las plantas presentaron tasas de crecimientos negativos (después de 25 días) observándose síntomas de clorosis y necrosis en los tejidos de las partes aéreas, por esta razón la experiencia culminó el día 28. El tratamiento de Ni100 mostró tasas de crecimiento negativas pero muchos mayores que en los tratamientos con Ni500 y Comb500, demostrando que la presencia de este metal ya sea solo o combinado con Cr y Zn, es tóxica en comparación con los demás tratamientos. Los elementos Cr, Ni y Zn están involucrados en una variedad de funciones críticas relacionadas con el control de genes, el transporte de oxígeno y enzimas del metabolismo (Bonilla, 2008). Sin embargo, cuando las concentraciones de metales alcanzan un valor umbral se convierten primero en inhibidores y luego son tóxicos.

Comparado con las macrófitas flotantes, estos resultados son consistentes con aquellos observados por Hadad *et al.*, (2007) y Mufarrege *et al.*, (2010), quienes reportaron que *S. herzogii* y *P. stratiotes* fueron más tolerantes al Cr y al Zn que al Ni. Por otra parte, Delgado *et al.*, (1993) observaron que *Eichhornia crassipes* también toleró Cr y Zn. Sin embargo, es importante de remarcar que estas especies flotantes fueron expuestas a concentraciones de metales significativamente menores que las utilizadas en nuestro trabajo, siendo del orden de 1 a 10 mg L<sup>-1</sup>. A pesar de las altas concentraciones de metales, Cr y Zn no produjeron toxicidad en la concentración de clorofila (Figura 10b). El Cr aumenta la disponibilidad de Fe biológicamente activo en los tejidos vegetales (Bonet *et al.*, 1991) y Zn está involucrado en los procesos fotosintéticos (Bonilla, 2008).

Los tratamientos con Ni y metales combinados mostraron una menor concentración de clorofila que las obtenidas en el control. Manios *et al.*, (2003) sugirieron un aumento de la hidrólisis de la clorofila cuando se expuso a *Typha latifolia* a metales combinados (4 mg L<sup>-1</sup> Cd, 80 mg L<sup>-1</sup> Cu, 40 mg L<sup>-1</sup> Ni, 40 mg L<sup>-1</sup> Pb, and 80 mg L<sup>-1</sup> Zn). En cuanto a los estudios de especies flotantes, Hadad *et al.*, (2011) observaron un efecto tóxico sobre la concentración de clorofila de *E. crassipes* cuando se la expuso a una concentración de Ni de 1

mg L<sup>-1</sup>. A pesar de la inhibición del crecimiento observada, *T. domingensis* fue tolerante a Cr y Zn. Chandra y Yadav (2010) evaluaron el potencial de *T. angustifolia* para ser usada en fitoremediación de metales pesados de soluciones acuosas conteniendo 296,32 mg L<sup>-1</sup> Fe, Cr 2,43 mg L<sup>-1</sup>, Pb 33,92 mg L<sup>-1</sup>, 48,0 mg L<sup>-1</sup> Cu y 8,0 mg L<sup>-1</sup> Cd, demostrando que dicha especie fue tolerante a las condiciones expuestas.



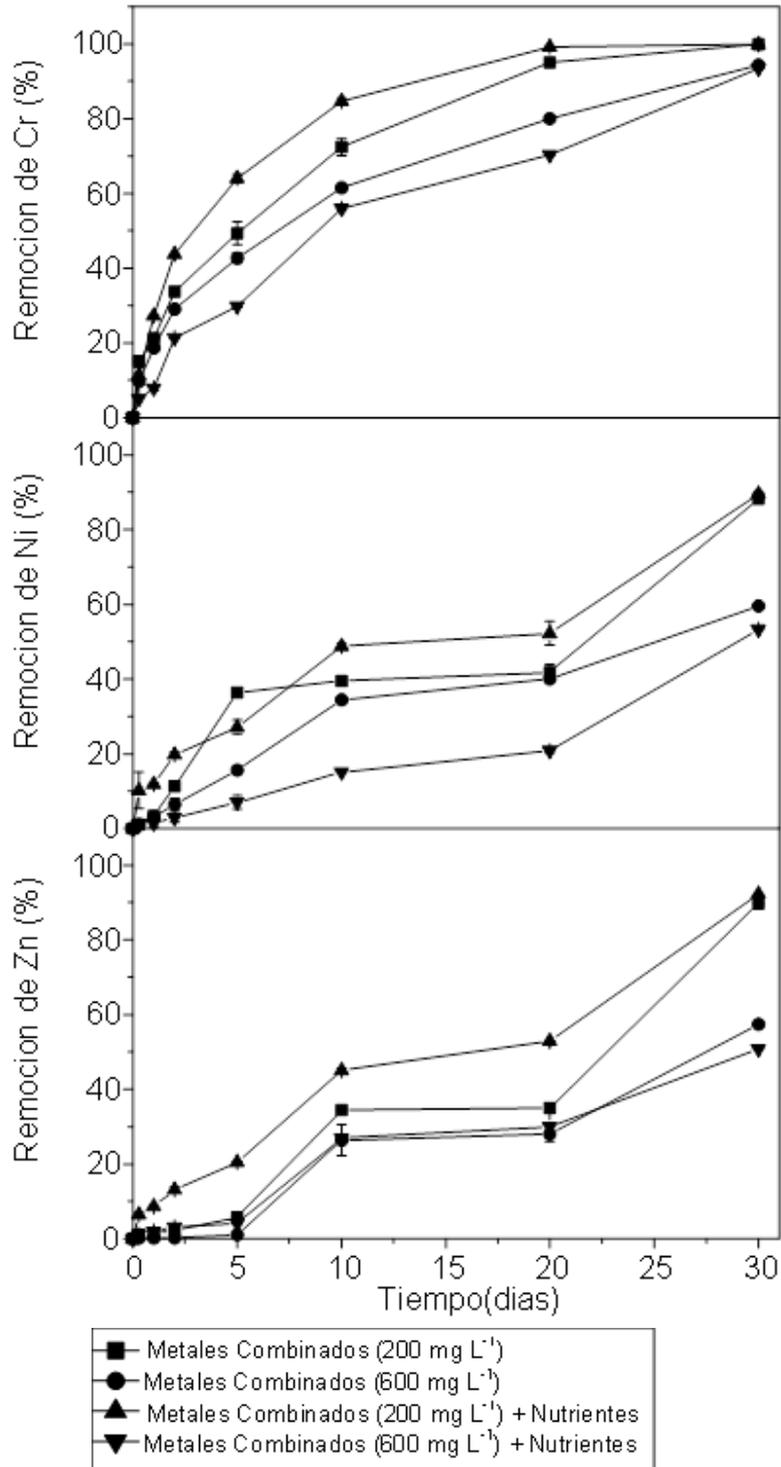
**Figura 10:** Tasas de crecimiento relativo (a) (R) (cm cm<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) y porcentaje de aumento de clorofila (b) (%) de *T. domingensis*. en cada muestreo. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Tomado de Mufarrege *et al.* (2015).

*Typha domingensis* fue afectada por el Ni y la combinación de metales después del día 25, sin embargo dicha especie fue eficiente en la eliminación de los metales en agua y en la acumulación en sus tejidos en todos los tratamientos. Nuestros resultados demuestran que en el caso de un volcado accidental de altas concentraciones de Cr, Ni y Zn, *T. domingensis* es capaz de tolerar estas condiciones y ser eficiente en la eliminación de metales del sistema.

### ***Efectos de nutrientes sobre la respuesta T. domingensis a altas concentraciones de metales***

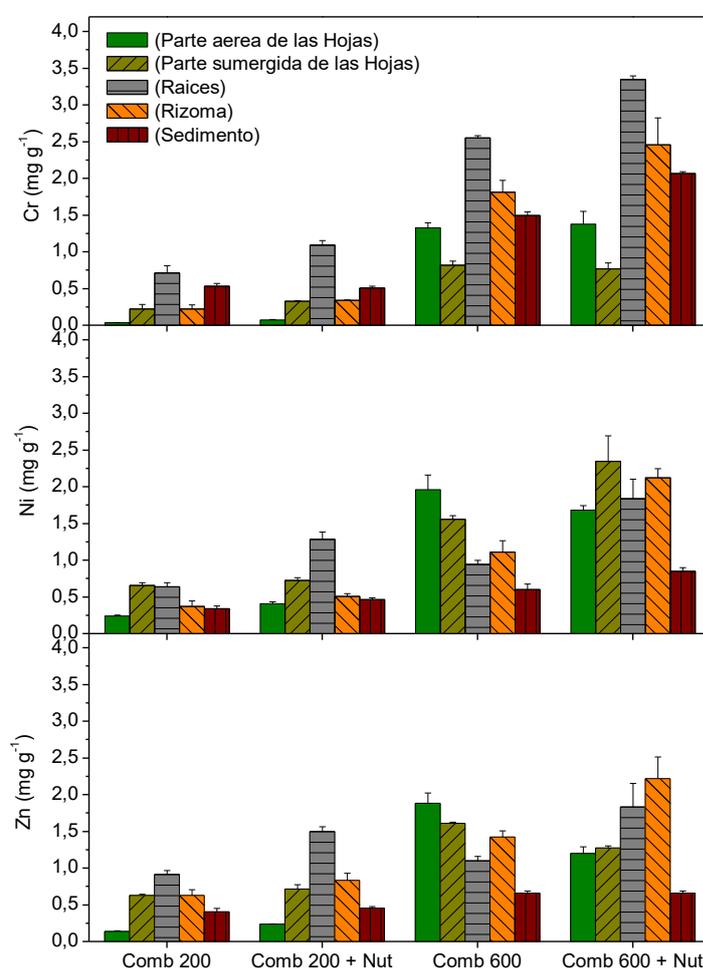
A fin de determinar si la presencia de nutrientes inhibía el efecto tóxico de las altas concentraciones de metales, se realizó otro experimento, adicionándose nutrientes además de metales. Los tratamientos fueron: 200 mg L<sup>-1</sup> Cr+Ni+Zn (Comb200); 600 mg L<sup>-1</sup> Cr+Ni+Zn (Comb600); 200 mg L<sup>-1</sup> Cr+Ni+Zn+50 mg L<sup>-1</sup> P +50 mg L<sup>-1</sup> N (Comb200+nut); y 600 mg L<sup>-1</sup> Cr+Ni+Zn+50 mg L<sup>-1</sup> P +50 mg L<sup>-1</sup> N (Comb600+nut).

Para los tres metales, las remociones en agua fueron más bajas en los tratamientos Comb600 y Comb600+nut que en Comb200 y Comb200 + nut (Figura 11). El Cr mostró la mayor remoción del agua. No hubo diferencias significativas entre tratamientos con y sin agregado de nutrientes a las menores concentraciones. A las mayores concentraciones (Comb600) la adición del nutriente no favoreció la remoción de Ni y Zn.



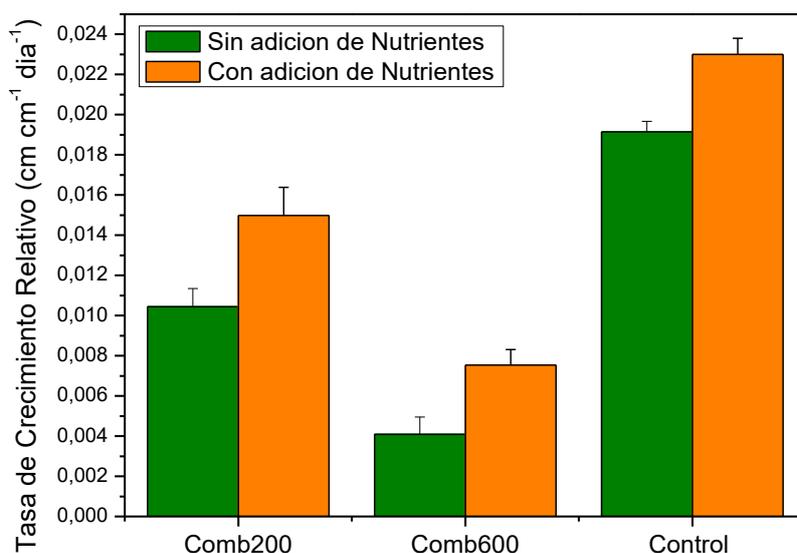
**Figura 11:** Porcentaje de remoción de Cr, Ni y Zn del agua a lo largo del tiempo en tratamientos con y sin agregado de nutrientes.

En la Figura 12 se observa que para los tres metales la adición de nutrientes favoreció la acumulación de metales en tejidos. Las mayores concentraciones de Cr fueron observadas en raíces. Sin embargo, en los tratamientos Comb600, la concentración de Ni y Zn fue notablemente alta en la parte aérea de las hojas, lo que indica una importante translocación. Las partes sumergidas de las hojas también presentaron alta concentración de Ni y Zn, probablemente debido a sorción por contacto directo con la solución. Las concentraciones de metales en los sedimentos fueron bajas en comparación con los tejidos vegetales.



**Figura 12.** Concentraciones finales de Cr, Ni y Zn ( $\text{mg g}^{-1}$ ) en raíces, rizomas, partes aéreas de hojas, partes sumergidas de hojas de *T. domingensis* y sedimentos. Las barras representan desviaciones estándar.

Las tasas de crecimiento relativo fueron positivas en todos los tratamientos, pero fueron significativamente menores que las obtenidos en el control, demostrando inhibición del crecimiento por metales. Sin embargo, no se observaron plantas muertas. Los tratamientos con adición de nutrientes mostraron una tasa de crecimiento relativo significativamente mayor que los obtenidos en los tratamientos sin la adición de nutrientes (Figura 13). Göthberg *et al.* (2004) encontraron que el enriquecimiento con nutrientes aumentó la tolerancia de *Ipomoea aquatica* cuando fue sometida a Cd, Pb y Hg.



**Figura 13:** Tasas de crecimiento relativo (R) (cm cm<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) de *T. domingensis* en cada muestreo, medido en tratamientos con y sin agregado de nutrientes.

## Reflexión final

De acuerdo a lo expuesto puede concluirse que *T. domingensis* posee una alta capacidad de tolerancia y adaptabilidad a condiciones extremas, modificando su morfología y fisiología. Es necesario profundizar los estudios para comprender la capacidad adaptativa y la tolerancia de esta especie, lo que permitiría no sólo optimizar técnicas de fitoremediación sino también proteger a los ecosistemas naturales de cualquier evento que genere un riesgo a su integridad.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional del Litoral (UNL)-CAI+D Proyecto y Agencia de Promoción Científica y Tecnológica por proveer los fondos necesarios para realizar estos trabajos.

## Referencias Bibliográficas

- Amarante L, Lima JD, Sodek L. 2006. Growth and stress conditions cause similar changes in xylem amino acids for different legume species. *J Exp Bot* 58:123-9.
- Bonet A, Poschenrieder C, Barceló J. 1991. Chromium III-Iron interactions in Fe-deficient and Fe-sufficient bean plants. I. Growth and nutrient content. *J Plant Nut* 14: 403-414.
- Bonilla I. 2008. Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal (Azcón-Bieto, J, Talón, M. eds.). Mc Graw Hill-UBe. 103-121 pp.
- Chandra R, Yadav S. 2010. Potential of *Typha angustifolia* for phytoremediation of heavy metals from aqueous solution of phenol and melanoidin. *Ecol Eng* 36: 1277-1284.
- D' Ambrogio de Argüeso A. 1986. Manual de técnicas en histología vegetal. I-IV. Hemisfero Sur S. A., Buenos Aires. 83 pp.
- Delgado M, Bigeriego M, Guardiola E. 1993. Uptake of Zn, Cr and Cr by water Hyacinths. *Wat Res* 27 (2): 269-270.
- Dimitri MJ. 1977. Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería. Descripción de las plantas cultivadas. Tomo I. Primer volumen. Ed. ACME, 3 era. ed. Bs. As. 1161 p.
- Dordio AV, Belo M, Martins Teixeira D, Palace Carvalho AJ, Dias CMB, Picó Y. Pinto AP. 2011. Evaluation of carbamazepine uptake and metabolization by *Typha spp.*, a plant with potential use in phytotreatment. *Biores Technol* 112: 7827-7834.
- Fediuc, E., Lips, S.H. y Erdei, L. 2005. O-Acetylserine (thiol) lyase activity in Phragmites and Typha plants under cadmium and NaCl stress conditions and the involvement of ABA in the stress response. *J. Plant Physiol.* 162: 865-872.

- Fonder, N. y Headley, T. 2013. The taxonomy of treatment wetlands: a proposed classification and nomenclature system. *Ecol. Eng.* 51: 203-211.
- Glenn, E., Thompson, L.T., Frye, R., Riley, J. y Baumgartner, D. 1995. Effects of salinity on growth and evapotranspiration of *Typha domingensis* Pers. *Aquat. Bot.* 52: 75-91.
- Göthberg A, Greger M, Holm K, Bengtsson BE. 2004. Influence of nutrient levels on uptake and effects of mercury, cadmium and lead in water spinach. *J Environ Qual* 33: 1247-1255.
- Greger M. 1999. Metal availability and bioconcentration in plants, in: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J. (Eds.) *Heavy Metals Stress in Plants: From Molecule to Ecosystems*. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, pp. 1-27.
- Hadad HR, Maine MA, Bonetto C. 2006. Macrophyte growth in a pilot-scale constructed wetland for industrial wastewater treatment. *Chemosphere* 63(10): 1744-1753.
- Hadad HR, Maine MA, Mufarrege MM, del Sastre MV, Di Luca GA. 2011. Bioaccumulation kinetics and toxic effects of Cr, Ni and Zn on *Eichhornia crassipes*. *J Haz Mat* 190: 1016-1022.
- Hadad HR, Maine MA, Natale GS, Bonetto C. 2007. The effect of nutrient addition on metal tolerance in *Salvinia herzogii*. *Ecol Eng* 31(2): 122-131.
- Headley T, Tanner C. 2012. Constructed wetlands with floating emergent macrophytes: an innovative storm water treatment technology. *Crit Rev Environ Sci Technol* 42: 2261-2310.
- Hegazy AK, Adbel Ghani NT, El-Chaghaby GA. 2011. Phytoremediation of industrial wastewater potentiality by *Typha domingensis*. *Int J Environ Sci Tech* 8(3): 639-648.
- Hunt R. 1978. *Studies in Biology* N° 96. Edward Arnold Ltd.Lond.: 12-16.
- Jenssen P, Maehlum T, Krogstad T. 1993. Potential use of constructed wetlands for wastewater treatment in northern environments. *Water Sci Technol* 28(10):149-157.
- Kadlec RH, Wallace SD. 2009. *Treatment Wetlands*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Macek P, Rejmánková E. 2007. Response of emergent macrophytes to experimental nutrient and salinity additions. *Funct Ecol* 21: 478-488.
- Maine MA, Suñe N, Hadad H, Sánchez G, Bonetto C. 2006. Nutrient and metal removal in a constructed wetland for waste-water treatment from a metallurgic industry. *Ecol Eng* 26: 341-347.

- Maine MA, Hadad HR, Sánchez GC, Di Luca GA, Mufarrege MM, Caffaratti SE, Pedro MC. 2017. Long-term performance of two free-water surface wetlands for metallurgical effluent treatment. *Ecol Eng* 98, 372-377.
- Maine MA, Hadad HR, Sánchez GC, Mufarrege MM, Di Luca GA, Caffaratti SE, Pedro MC. 2013. Sustainability of a constructed wetland faced with a depredation event. *J Environ Manag* 128:1-6.
- Maine MA, Suñé N, Hadad HR, Sánchez G, Bonetto C. 2009. Influence of vegetation on the removal of heavy metals and nutrients in a constructed wetland. *J Environ Manag* 90(1):355-363.
- Maine MA, Suñé NL, Lagger SC. 2004. Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. *Water Res* 38: 1494-1501.
- Manios T, Stentiford E, Millner P. 2003. The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferous water. *Ecol Eng* 20: 65-74.
- Mufarrege, M.M. Hadad, H.R. y Maine, M.A. 2010. Response of *Pistia stratiotes* to heavy metals (Cr, Ni, and Zn) and phosphorous. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* 58(1): 53-61.
- Mufarrege, M.M., Hadad, H.R., Di Luca, G.A. y Maine, M.A. 2014. Metal dynamics and tolerance of *Typha domingensis* exposed to high concentrations of Cr, Ni and Zn. *Ecotoxicology Environmental Safety.* 105: 90-96.
- Mufarrege MM, Di Luca GA, Hadad HR, Maine MA. 2015. *Typha domingensis* ability to accumulate and tolerate high concentrations of Cr, Ni and Zn. *Environ Sci Pollut Res* 22: 286-292.
- Munns R, Greenway H. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annu Rev Plant Physiol* 31: 149-90.
- Nilratnisakorn S, Thiravetyan P, Nakbanpote W. 2007. Synthetic reactive dye wastewater treatment by narrow-leaved cattails (*Typha angustifolia* Linn.): Effects of dye, salinity and metals. *Sci Tot Environ* 384: 67-76.
- Panigatti MC, Maine MA. 2003. Influence of nitrogen species (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) on the dynamics of P in water-sediment–*Salvinia herzogii* systems. *Hydrobiologia* 492: 151-157.
- Parida AK, Das AB. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol Environ Saf* 60: 324-49.
- Prasad MNV, Freitas HMO, 2003. Metal hyperaccumulation in plants-biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electron J Biotechnol* 6, 285-321.

- Rossmann M, Matos AT, Abreu EC, Silva FF, Borges AC. 2013. Effect of influent aeration on removal of organic matter from coffee processing wastewater in constructed wetlands. *J Environ Manag* 128:912-919.
- Sukumaran D. 2013. Phytoremediation of heavy metals from industrial effluent using constructed wetland technology. *Appl Ecol Environ Sci* 1:92-97.
- Sundby B, Caetano M, Vale C, Gobeil C, Luther G, Nuzzio D. 2005. Root-induced cycling of lead in salt marsh sediments. *Environ Sci Technol* 39, 2080-6.
- Suñe N, Sánchez G, Caffaratti S, Maine MA. 2007. Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. *Environ Poll* 145(2): 467-473.
- Thomson WW. 1975. The structure and function of salt glands. En: Pojkoff Mayber A, Gale J, (Eds.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medical and Aromatic Plant II*. Springer Verlag, Berlin, pp. 118-48.
- Verlicchi P, Zambello E. 2014. How efficient are constructed wetlands in removing pharmaceuticals from untreated and treated urban wastewaters? A review. *Sci Total Environ* 470:1281-1306.
- Vymazal J. 2007. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Sci Tot Environ* 380:48-65.
- Vymazal J. 2011. Constructed wetlands for wastewater treatment: Five decades of experience. *Environ Sci Technol* 45:61-69.
- Vymazal J, 2013. Emergent plants used in free water surface constructed wetlands: A review. *Ecol Eng* 61P: 582-592.
- Wu S, Wallace S, Brix H, Kuschik P, Kipkemoi Kirui W, Masi F, Dong R. 2015. Treatment of industrial effluents in constructed wetlands: Challenges, operational strategies and overall performance. *Environ Poll* 201:107-120.
- Zhang DQ, Jinadasa KB, Richard MG, Liu Y, Ng WJ, Tan SK. 2014. Application of constructed wetlands for wastewater treatment in developing countries: A review of recent developments (2000-2013). *J Environ Manag* 141:116-131.

## **Acerca de los autores**

Dra. MARÍA DE LAS MEERCEDES MUFARREGE

Dra. GISELA ALFONSINA DI LUCA

Dra. HERNÁN RICARDO HADAD

Dra. MARÍA ALEJANDRA MAINE

Laboratorio de Química Analítica, Facultad de Ingeniería Química.  
Instituto de Química Aplicada del Litoral (IQAL) CONICET- Universidad  
Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina.

## **Acerca del primer autor**

María de las Mercedes Mufarrege es Doctora en Ciencias Biológicas egresada de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Actualmente se desempeña como Investigadora Adjunto del CONICET. Ha sido distinguida por sus trabajos en varias oportunidades y ha participado de congresos internacionales sobre la dinámica de contaminantes en humedales. Ha realizado tareas de transferencia de resultados de la investigación al sector productivo que es una de las fortalezas del grupo de investigación al que pertenece. Su tema particular de estudio es “Tolerancia y eficiencia de *Typha domingensis* en la retención de metales en condiciones de diferentes pH y salinidad”.

# Utilización de la hidrófita *Ludwigia peploides* para biomonitoreo del herbicida glifosato en ecosistemas acuáticos. Estudio en una cuenca del sudeste bonaerense

---

Débora Jesabel Pérez, Elena Okada, Mirta Luján Menone, Virginia Carolina Aparicio, José Luis Costa

## RESUMEN

*Ludwigia peploides* (H.B.K.) o “falsa verdolaga” (Fam. Onagracea) es una hidrófita perenne nativa de Sudamérica. *L. peploides* se encuentra ampliamente distribuida en arroyos del sudeste bonaerense, lo cual permite el estudio de esta especie como biomonitor de contaminantes de origen agrícola. Este trabajo tuvo como objetivos, 1) establecer y validar una metodología de extracción y cuantificación de glifosato en *L. peploides*, 2) determinar el rol de esta especie como biomonitora de glifosato en la cuenca agrícola-ganadera del arroyo “El Crespo”. En el mes de marzo de 2016 se recolectaron especímenes de *L. peploides* en ocho sitios de muestreo del arroyo. En forma simultánea se colectaron muestras de agua superficial y sedimento. Las muestras vegetales se secaron (60°C), molieron y tamizaron utilizando una malla de 50 µm. Para la extracción de glifosato se pesaron 0,5 gr de tejido vegetal, fortificado con estándar interno de glifosato y luego se agregó agua ultrapura. El extracto vegetal obtenido se trató con carbón activado para disminuir el efecto matriz. Para las muestras de agua y sedimentos se utilizó un método de extracción alcalino. Luego de la extracción todas las muestras fueron derivatizadas con 9-cloroformiato de fluorenilmetilo. La detección y cuantificación se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas. Los límites de detección y cuantificación en tejido vegetal fueron 4 y 12 µg Kg<sup>-1</sup>, respectivamente. La recuperación del método fue del 117% (± 20%). La frecuencia de detección de glifosato en las muestras de *L. peploides* fue de 93%. Los niveles variaron entre 16 – 108 µg Kg<sup>-1</sup>, encontrándose la mayor

concentración en sitios localizados aguas arriba del arroyo. En el sitio de mayor acumulación de glifosato en *L. peploides*, se registró la concentración más alta en el agua superficial. Sin embargo, no se encontró una relación entre la concentración en los sedimentos y la acumulación de glifosato en las hidrófitas. El hábito de crecimiento perenne y las características anatómicas de la especie, como la ausencia de cutícula, epidermis delgada y hojas anfistomáticas, podrían favorecer el ingreso de glifosato, así como también de otros plaguicidas hidrofílicos de uso corriente.

**Palabras claves:** hidrófita, glifosato, bioacumulación, cuenca agrícola-ganadera

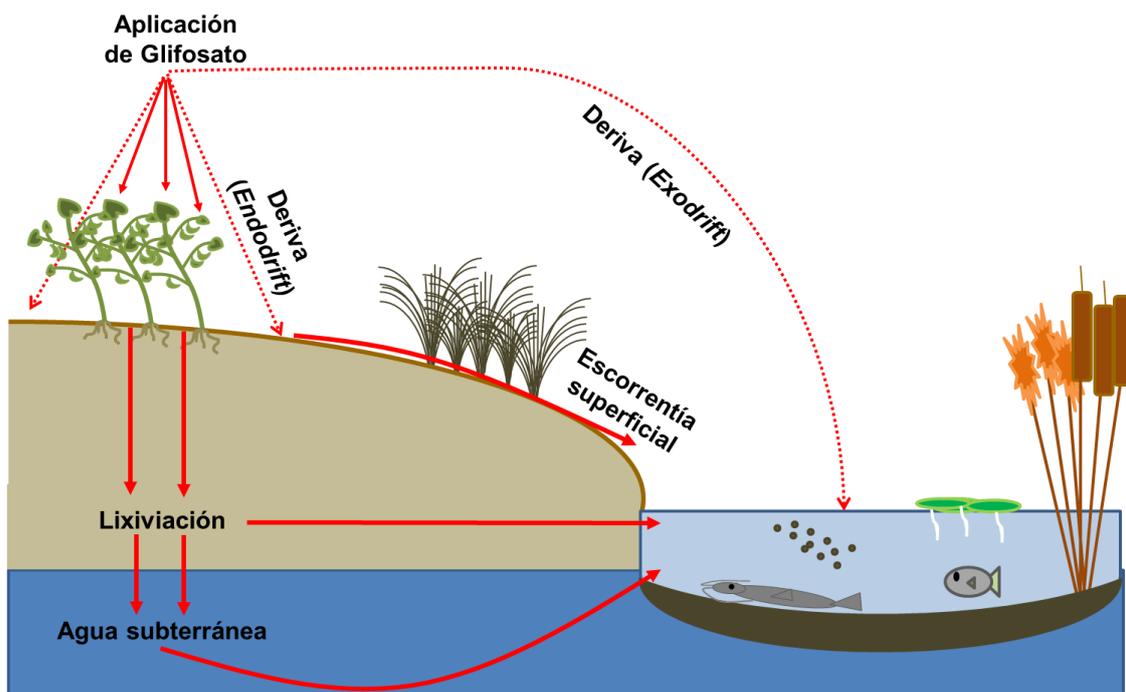
## Glifosato en el ambiente

De todos los contaminantes presentes en el medio ambiente, los plaguicidas son los más ampliamente criticados debido a su aplicación masiva y directa en los sistemas naturales. La aplicación de plaguicidas en los ambientes bajo cultivo a veces resulta en la introducción de forma directa o indirecta de las áreas adyacentes. Este hecho crea preocupación ya que tanto las poblaciones humanas y naturales resultan expuestas a los agroquímicos (Connell, 2005). En la Argentina, la actividad agropecuaria se encuentra fuertemente ligada a la disponibilidad de agua, lo cual resulta en una relación directa de la localización de los campos cultivados con ecosistemas acuáticos superficiales y/o subterráneos. La aplicación de agroquímicos en toda la extensión de los campos, puede causar una introducción directa en el suelo (*endodrift*), en los cursos de agua superficiales por deriva (*exodrift*) (Himel, 1974), y luego también pueden incorporarse por eventos de esorrentía superficial y lixiviación principalmente (Figura 1).

En las últimas décadas, el uso de plaguicidas orgánicos caracterizados por su alta persistencia ambiental y lipofilicidad provocó un amplio rango de efectos negativos sobre los ecosistemas debido a su capacidad de bioconcentrarse y bioacumularse en los organismos. Por esta razón,

actualmente se utilizan plaguicidas menos persistentes y más solubles en agua, es decir más hidrofílicos, disminuyendo así la capacidad de acumularse en los organismos (Alvarez *et al.*, 2008).

El glifosato, es un herbicida post-emergente no selectivo usado a nivel mundial para el control de diversas gramíneas, malezas de hoja ancha y hierbas acuáticas (Zhang *et al.*, 2011). Basados en las propiedades físico-químicas del glifosato, como su alta afinidad a las partículas del suelo, resulta esperable que este herbicida tenga baja movilidad en el suelo (Okada *et al.*, 2016). Sin embargo, la alta polaridad y solubilidad en agua (Log Kow = -3,57 a 20°C) pueden explicar su presencia frecuente en los cuerpos de agua superficiales.



**Figura 1:** Dispersión ambiental del herbicida glifosato.

Según los informes de la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE) del total de agroquímicos vendidos, el glifosato representa aproximadamente el 65% de las ventas, convirtiéndose de esta manera en el agroquímico más vendido y más utilizado en la actividad agrícola en nuestro país (CASAFE, 2012). Los formulados comerciales que contienen un 54% de ingrediente activo son los más utilizados actualmente. El glifosato puede aplicarse hasta tres veces sobre los cultivos transgénicos, como la soja, trigo y algodón. La primera aplicación se realiza para preparar el suelo para el cultivo en siembra directa, el llamado barbecho químico; la segunda aplicación se realiza previa a la siembra y la tercera aplicación durante el crecimiento del cultivo. En este sentido, las tasas de aplicaciones anuales de glifosato pueden variar desde 5 hasta 13 L/Ha dependiendo el tipo de cultivo.

El uso indiscriminado de este herbicida dentro de los agroecosistemas, ya sea por las altas dosis aplicadas y las reiteradas aplicaciones a lo largo de un año, es la principal razón por la cual el glifosato y su metabolito el ácido aminometilfosfónico (AMPA) son los residuos de plaguicidas más detectados en los ecosistemas acuáticos (Pérez *et al.*, 2016). Las concentraciones en ecosistemas superficiales de la Pampa Austral pueden oscilar entre 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  a 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  en aguas superficiales y desde 10-200  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  en sedimentos de fondo (Aparicio *et al.*, 2013; Ronco *et al.*, 2016; Pérez *et al.*, 2016).

El glifosato puede inducir efectos adversos en la biota acuática no blanco (Myers *et al.*, 2016), sumado a esto, en el año 2015 la Agencia Internacional de Investigaciones en Cáncer clasificó a este herbicida como probable carcinogénico en humanos (Grupo 2A) (Guyton *et al.*, 2015). En este sentido, la presencia en los distintos compartimientos ambientales debe ser considerada un tópico de estudio relevante necesario para implementar acciones que reduzcan sus posibles impactos ambientales.

## **Funciones ecosistémicas que brindan las hidrófitas**

Las hidrófitas o macrófitas acuáticas son un importante componente del sistema béntico de producción primaria, proporcionando oxígeno fotosintético,

interviniendo en el ciclado de nutrientes y en la estabilización de los sedimentos, proporcionando hábitats y refugios a invertebrados y peces (Freemark y Boutin, 1994; Arts *et al.*, 2010). También, proveen hábitats para polinizadores e insectos benéficos que actúan como controladores de plagas en los campos de cultivos adyacentes a ecosistemas acuáticos (Figura 2).

Como ya se mencionó, existe una vinculación frecuente y estrecha entre los cuerpos de agua superficiales y las tierras cultivadas, y en esta relación las hidrófitas juegan un rol central en la acumulación de plaguicidas. Existen diversos estudios que demuestran la capacidad de las hidrófitas flotantes, sumergidas o emergentes de acumular agroquímicos y de esta manera ser excelentes bioindicadores *in situ* de la calidad del agua superficial (Lewis, 1995; Carvahlo *et al.*, 2007; Turgut, 2005; Pérez *et al.*, 2013, Gonzalez *et al.*, 2013).

Sin embargo, las hidrófitas pueden estar sometidas a un riesgo ecotoxicológico importante debido al impacto de los herbicidas, que siendo aplicados en los campos de cultivo, llegan a los cuerpos de agua. Para obtener datos precisos de la magnitud de la acumulación de plaguicidas en sus tejidos, se utilizan diferentes factores que indican la razón entre la cantidad de un compuesto en los tejidos y la concentración en el agua circundante, Factor de Bioconcentración (FBC) (ecuación 1) o en el sedimento donde la planta esté arraigada, Factor de Acumulación Biota-Sedimento (FABS) (ecuación 2).

$$\text{Ecuación 1} \quad FBC = \frac{[\text{Concentración del compuesto en los tejidos}]}{[\text{Concentración del compuesto en el agua}]}$$

$$\text{Ecuación 2} \quad FABS = \frac{[\text{Concentración del compuesto en los tejidos}]}{[\text{Concentración del compuesto en los sedimentos}]}$$



**Figura 2:** Funciones ecosistémicas que brindan las hidrófitas.

## Descripción y ciclo de crecimiento de *Ludwigia peploides*

El género *Ludwigia* (H.B.K.) (Fam. Onagraceae) es un género extenso y ampliamente distribuido en el mundo, contiene alrededor de 82 especies divididas en 23 secciones. El género exhibe un patrón biogeográfico complejo, con 10 secciones endémicas del Sur-Centro de América, tres de Norteamérica, cuatro de África, tres en Asia, dos en los Paleotrópicos, y dos son cosmopolitas (Hock *et al.*, 2011). La poliploidía está muy representada, con número cromosómicos gaméticos que van desde  $n = 8$  a  $n = 64$  (Hock *et al.*, 2011; Menone *et al.*, 2015).

La mayoría de las especies crecen en climas templados a subtropicales húmedos y tienen mucho vigor para crecer en ambientes acuáticos. Actualmente, el género se ha convertido en foco de estudio debido a la expansión de especies invasoras en países de Europa (Dandelot *et al.*, 2005; Bou Manobens y Font Garcia, 2016), así como también en estados del sur de Estados Unidos (Wood 2006). Fuertes evidencias moleculares y morfológicas ubicarían al género *Ludwigia* como una Familia hermana del resto de las Onagraceae (Hock *et al.*, 2011).

En Argentina el género está representado por 11 especies. *Ludwigia peploides* (H.B.K.) o “falsa verdolaga” es una especie nativa distribuida en los humedales naturales del sudeste de la provincia de Buenos Aires, y con una amplia distribución en las Américas, creciendo desde Estados Unidos y México hasta América del Sur (Lahitte y Hurell, 1997). Es una hidrófita flotante perenne que se desarrolla mediante crecimiento vegetativo durante los meses de otoño e invierno. Su crecimiento está caracterizado por tallos tendidos flotantes (rizomas) con hojas oblongas, raíces arraigadas y flotantes que crecen en los nudos. Antes de la floración, aparecen tallos ascendentes con hojas lanceoladas y en primavera - verano, se presentan las ramas floríferas ascendentes de hasta 60 cm con flores axilares amarillas (Lahitte y Hurell, 1997) (Figura 3).

Los ambientes pampásicos donde habita *L. peploides* son regiones de intensa actividad agrícola, por lo que la llegada de agroquímicos a los cuerpos de agua superficiales es un factor crucial que puede determinar la dinámica

poblacional de todo el ecosistema y en particular la bioacumulación de plaguicidas en las hidrófitas. Gonzalez et al., (2013) han evaluado la capacidad de *L. peploides* de acumular plaguicidas organoclorados en el sudeste bonaerense. Sin embargo, la falta de información acerca de la acumulación de plaguicidas de uso actual en hidrófitas llevó a realizar este estudio, el cual se focalizó en estudiar la capacidad de *L. peploides* de acumular glifosato en sus tejidos para ser utilizada como una especie biomonitora en ecosistemas acuáticos superficiales.



**Figura 3:** Ciclo de crecimiento anual de *Ludwigia peploides*. Fuente: A-B Pérez DJ.; C-E: <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Ludwigia+peploides>

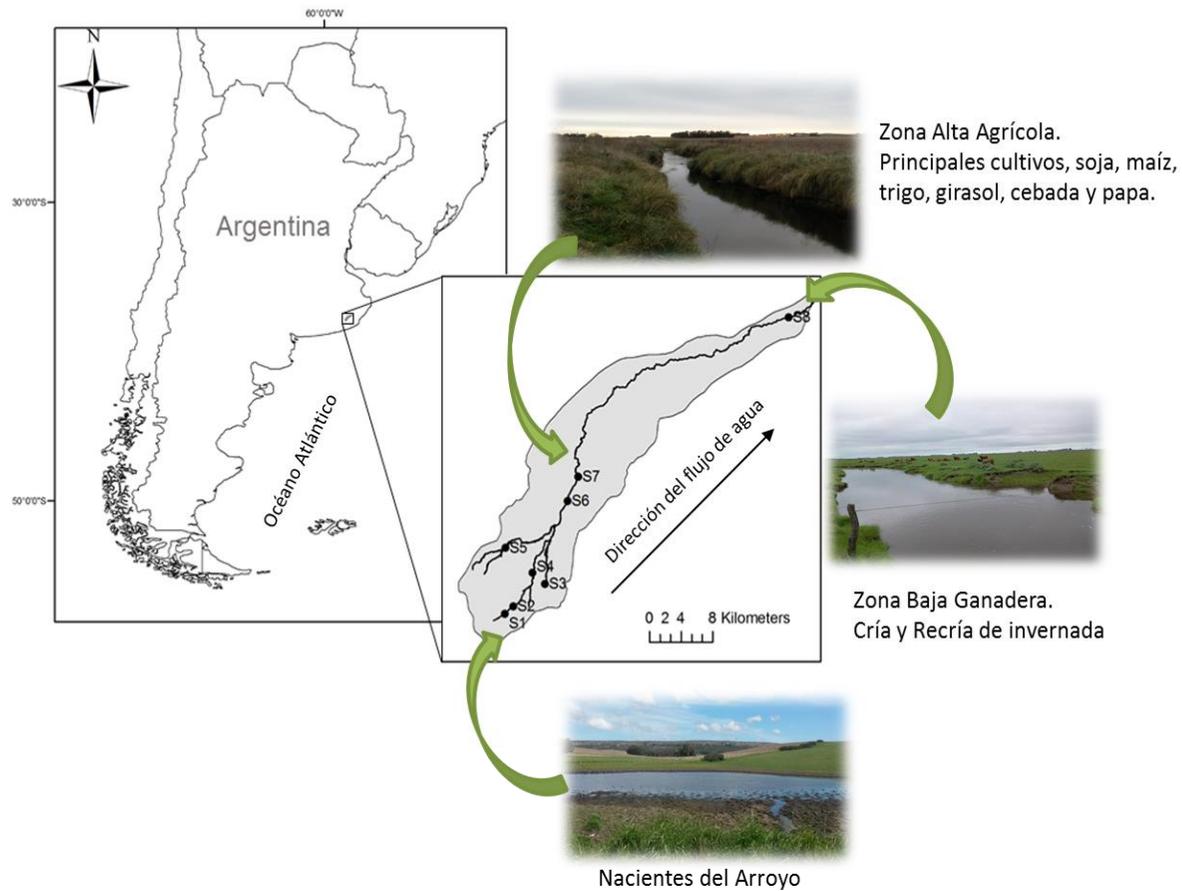
## Área de estudio y sitios de muestreo

El arroyo El Crespo es un arroyo de tercer orden, localizado al sudeste de la Provincia de Buenos Aires, en el Partido de Balcarce (Figura 3), con una cuenca que tiene una superficie de 490 km<sup>2</sup>. El sentido de dirección del flujo de agua es de Sur a Norte, recorriendo una distancia de 65 km. Esta cuenca se caracteriza por estar influenciada solamente por actividades agropecuarias, sin intervención de actividades urbanas o industriales, convirtiéndose en un sitio óptimo de estudio de procesos de contaminación por plaguicidas de uso agrícola.

Las nacientes del arroyo están localizadas en el Sistema de Tandilia con un sistema de drenaje continuo debido al aporte de agua subterránea. En esta zona de cuenca alta los suelos son Argiudoles Típicos aptos para el desarrollo de la agricultura. La desembocadura se encuentra en el extremo norte, localizado dentro de la planicie de inundación, caracterizado por suelos Natracuoles Típicos cubiertos de pastizales naturales, aptos para la ganadería, los cuales no presentan historial de aplicación de plaguicidas.

Los principales cultivos desarrollados en la zona durante la campaña 2014-2015 fueron soya, girasol, maíz, trigo, cebada, papa, sorgo, los cuales cubrieron una superficie de 45,48%, 17,51%, 9,96%, 15,12%, 6,33%, 2,32%, 1,89%, respectivamente, según las estimaciones del Ministerio de Agroindustria (SIIA, 2016) y las encuestas realizadas a los productores de la zona.

Para la realización de este trabajo, se determinaron ocho sitios de muestreo dentro del arroyo desde las nacientes hasta la desembocadura, y las muestras fueron tomadas en Marzo de 2016. Los sitios de muestreo fueron enumerados desde Sitio 1 (nacientes) hasta Sitio 8 (desembocadura) (Figura 4).



**Figura 4:** Delimitación de la cuenca del arroyo El Crespo y localización de los sitios de muestreo (Balcarce, Provincia de Buenos Aires, Argentina).

## Recolección y procesado de las muestras

Se colectaron 3 especímenes jóvenes de *L. peploides* en cada sitio. Estos se mantuvieron en bolsas llenas de agua del arroyo para el traslado al laboratorio. Luego, se los enjuagó tres veces con agua de la canilla, para retirar el material particulado y los posibles residuos de glifosato adheridos a las hojas. Se diseccionaron las hojas y se colocaron en bolsas de papel y se secaron a una temperatura constante de 60°C durante siete días. Posteriormente, se molieron y tamizaron con tamiz de 0,5 mm de malla.

En los mismos sitios se colectaron muestras de agua superficial y sedimentos del arroyo, las cuales fueron procesadas y analizadas para determinar la presencia y niveles de glifosato y AMPA, siguiendo la metodología de Aparicio *et al.*, (2013).

## Puesta a punto de la técnica de extracción de glifosato en

### *Ludwigia peploides*

Existen diferentes protocolos de extracción de glifosato en tejidos vegetales (Koskinen *et al.*, 2016). Debido a la diversidad en composición de los distintos tejidos vegetales en relación a los pigmentos fotosintéticos, el contenido proteico y lipídico, no hay una metodología estandarizada para la extracción del herbicida. Por esta razón, es necesario determinar un protocolo óptimo para ser utilizado en cada modelo vegetal.

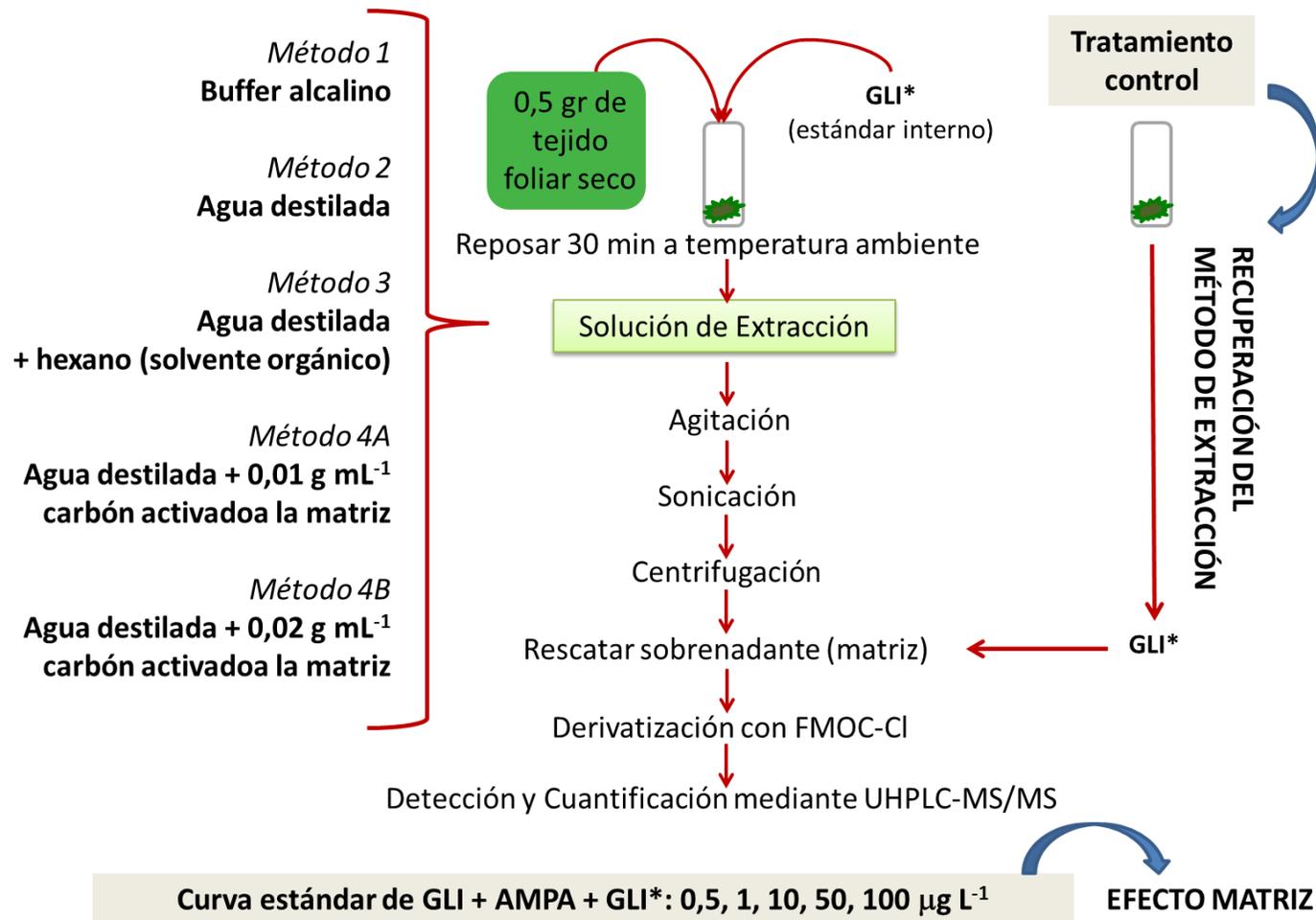
Para ello se utilizaron diferentes soluciones para la extracción de glifosato en hojas. Para todos se utilizaron submuestras de 0,5 gr de tejido seco, las cuales fueron fortificadas con una solución stock de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de [1,2- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-glifosato (GLI\*) (Figura 5). En cada uno de los métodos de extracción se prepararon muestras controles, que consistieron en muestras de tejido de hoja que fueron tratadas de la misma forma que las muestras de los diferentes métodos, donde la alícuota de GLI\* fue adicionada al extracto final de la muestra. Mediante estos controles se evalúa el efecto producido por la matriz vegetal y la recuperación del método de extracción. Para cada juego de

muestras analizadas se preparó una curva estándar con seis concentraciones (0,5; 1; 10; 20; 50 y 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) y con una cantidad de GLI\* equivalente a la concentración final en las muestras analizadas. Luego del paso de extracción las muestras, muestras controles y las curvas estándar fueron derivatizadas con 2 mL de una solución de 1  $\text{mg mL}^{-1}$  of 9-fluorenil-metil-cloroformiato (FMOC-Cl) en acetonitrilo por 12 hs en oscuridad.

Posteriormente, todas las muestras fueron agitadas con 5 mL de diclorometano durante 3 min y centrifugadas a 3000 rpm. La fase hidrofílica fue filtrada a través de una malla de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$  y fue colocada en un vial de 1 mL de capacidad para la determinación de glifosato mediante UHPLC-MS/MS.

El LD para glifosato y AMPA en tejido foliar fue definido como la mínima concentración a la cual el analito difiere del ruido y se obtuvo con la concentración más baja a la cual la relación señal/ruido fue 3. El LC se consideró como la mínima concentración validada por el método usando las muestras controles fortificadas con recuperaciones entre 70% y 120% y una precisión medida a través del desvío estándar relativo (DER) menor a  $\leq 20$  (Ibáñez *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos de los distintos métodos de extracción se muestran en la Tabla 1. El método 1, basado en una extracción alcalina, tuvo una tasa de recuperación baja  $< 20\%$  y un efecto matriz de interferencia alta (70%). En el método 2, basado en una extracción en fase acuosa, se obtuvo una reducción de la interferencia de la matriz del 50%, sin embargo la recuperación del GLI\* en las muestras controles fue similar al método 1. La extracción en fase acuosa resultó más satisfactoria cuando los extractos fueron tratados con un solvente orgánico, en este caso hexano (método 3); sin embargo la interferencia de la matriz fue alta. El método 4A, basado en una extracción acuosa y un paso de limpieza del extracto con 0,01  $\text{g mL}^{-1}$  de carbón activado vegetal resultó ser el óptimo. En este método se obtuvo una precisión alta en la cuantificación del glifosato (DER  $< 20\%$ ) y una recuperación altamente satisfactoria en las muestras controles de  $110 \pm 23\%$ .



**Figura 5:** Procedimiento de extracción de glifosato y su metabolito ácido metil-fosfónico (AMPA) en hojas de *Ludwigia peploides*. GLI: glifosato. Fmoc-Cl: 9-cloroformiato de fluorenilmetilo. Gli\*: [1,2-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]-glifosato.

Estos resultados están en concordancia con otros estudios en los cuales se han desarrollado métodos de extracción para plantas terrestres, basados en extracciones en fase acuosa (Hernández *et al.*, 2000; Gosciny *et al.*, 2012). El principal problema de la extracción realizada en fase acuosa es la presencia de otros compuestos solubles en agua presentes en el tejido vegetal que podrían interferir en el análisis. Para reducir esta interferencia desde la matriz es necesario implementar un paso de limpieza de la misma para eliminar estas moléculas solubles. Por ejemplo, para tejidos vegetales con alto contenido de proteínas y/o lípidos, una limpieza con un solvente orgánico resulta efectivo (Gosciny *et al.*, 2012); para un tejido rico en clorofilas es conveniente utilizar algún tipo de sorbente, como por ejemplo el carbón activado vegetal, debido a la alta afinidad de ambas moléculas (Agilent, 2016). En hojas de *Ludwigia peploides*, la limpieza del extracto con 0,01 g mL<sup>-1</sup> resultó efectiva. Una concentración mayor de carbón activado resultó en un incremento en el efecto matriz, debido posiblemente a que el carbón activado podría secuestrar moléculas de glifosato. En base a estos resultados, el método 4A fue el utilizado para los análisis posteriores de las muestras ambientales de *L. peploides*.

Los LD y LC de glifosato y AMPA en hojas de *L. peploides* fueron establecidos en 4 µg Kg<sup>-1</sup> y 12 µg Kg<sup>-1</sup> de peso seco.

**Tabla 1:** Recuperación del glifosato y efecto matriz para los diferentes métodos de extracción en hojas de *Ludwigia peploides*.

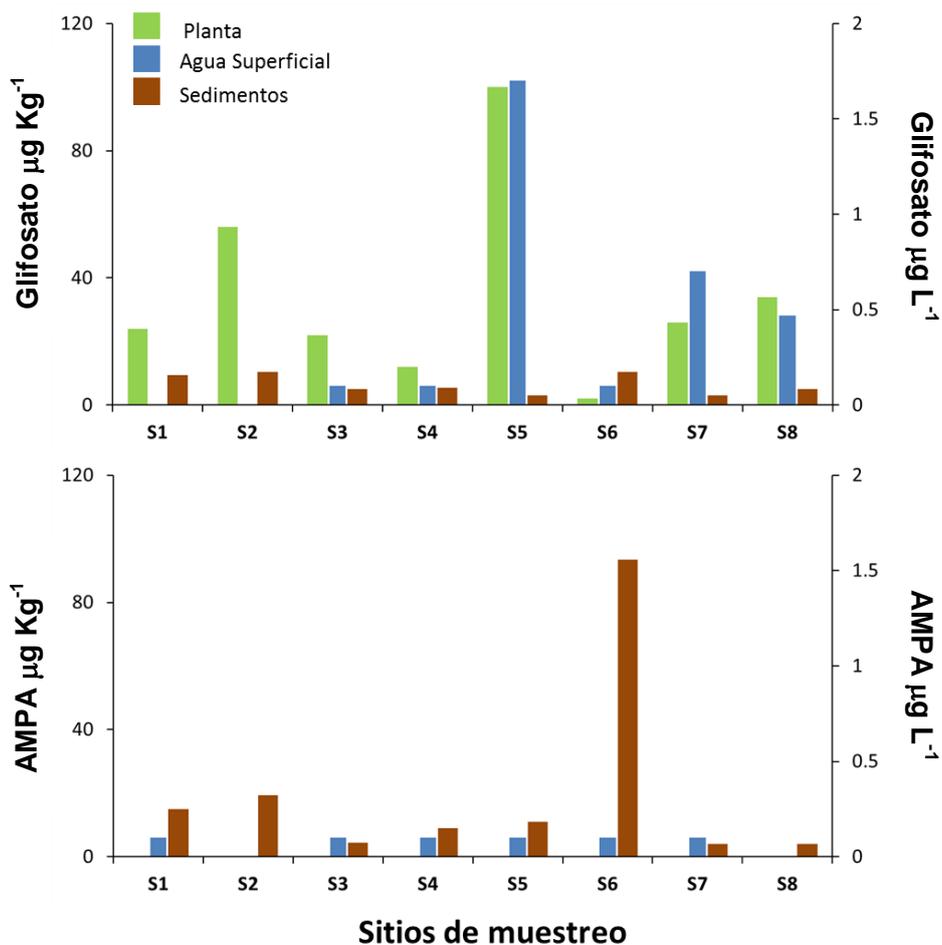
Método de Extracción	Recuperación (%)	Efecto Matriz (%)
1	< 20	70
2	< 20	50
3	40	50
4A	117 ± 20	20
4B	110 ± 23	40

## Biomonitoreo de glifosato utilizando *Ludwigia peploides*

En la campaña de cultivo que abarcó el período 2014-2015, la superficie sembrada con organismos transgénicos dentro de la cuenca del arroyo El Crespo se estimó en 147 Km<sup>2</sup> (SIIA, 2016). En relación a esto, el plaguicida más detectado en agua superficial y sedimentos durante este período de siembra fue el glifosato y su metabolito AMPA (Pérez *et al.*, 2016).

En el presente estudio, el glifosato y el AMPA fueron detectados en el 75% y el 100% de las muestras de agua superficial y sedimentos. Las concentraciones de glifosato en agua superficial oscilaron entre 0 – 1,7 µg L<sup>-1</sup> y las de AMPA entre 0 – 0,1 µg L<sup>-1</sup>, mientras que en los sedimentos los niveles variaron entre 3,0 – 10,5 µg Kg<sup>-1</sup> y 3,5 – 93,5 µg Kg<sup>-1</sup>, para glifosato y AMPA, respectivamente. La frecuencia de detección de glifosato en hojas de *L. peploides* fue de 94,1 %, mientras que no se detectaron residuos de AMPA en este tejido. Los niveles de glifosato en el tejido foliar variaron entre 4,0 y 108,0 µg Kg<sup>-1</sup> de peso seco (Figura 6).

El herbicida glifosato se detectó en todos los sitios donde se colectó *L. peploides*, incluyendo el S8 que no posee historial de aplicación de agroquímicos. Los niveles de glifosato en las hojas no mostraron un patrón definido en relación con los usos del suelo en la cuenca. En el sitio S8, donde no se usan agroquímicos, los niveles fueron similares a los detectados en sitios de muestreo adyacentes a campos agrícolas; sugiriendo que las moléculas del herbicida pueden sufrir escurrimiento superficial transportadas por el agua o por la deposición de sedimentos llegando finalmente aguas abajo y acumulándose en la biota. En el sitio S5 se detectaron los mayores niveles de glifosato, alcanzando en las hojas valores de 100,0 ± 11,3 µg Kg<sup>-1</sup> y en agua superficial de 1,7 µg L<sup>-1</sup> (Figura 6). En el resto de los sitios de muestro la acumulación de glifosato pudo ocurrir por diferentes vías de entrada del herbicida a los tejidos de *L. peploides*. En los sitios S1 y S2 donde el glifosato no fue detectado en el agua superficial circundante, los procesos de ingreso como la deposición de moléculas en las hojas flotantes o el ingreso desde los sedimentos hacia las raíces arraigadas pudo contribuir de forma sustancial.



**Figura 6:** Niveles de glifosato y ácido aminometil-fosfónico (AMPA) en *Ludwigia peploides*, agua superficial y sedimentos.

Al momento de la recolección, las plantas no presentaban manifestaciones de contacto con el herbicida a nivel macroscópico (ausencia de síntomas de clorosis o blanqueamiento de las hojas). Este hecho es importante porque la presencia de residuos de glifosato podría inducir efectos subletales a nivel suborganismo, como se han demostrado en otras especies (Boutin *et al.*, 2014) o también podría generar efectos de tipo hormético, como es el incremento en la biomasa que ha sido estudiado en especies terrestres (Cedergreen *et al.*, 2007; Cedergreen, 2008).

En el presente estudio, hemos evaluado la magnitud de los procesos de bioconcentración y bioacumulación de glifosato y AMPA en los tejidos de *L. peploides* a través de los cálculos de FBC y FABS. Ambos parámetros fueron

muy variables entre los individuos de distintos sitios respecto a el compuesto parental. Mientras que para el metabolito, no se pudieron calcular debido a la ausencia de AMPA en las hojas. En los sitios S1 y S2 donde no se detectó glifosato en agua superficial, no fue posible calcular los FBC. En los sitios restantes donde se calcularon los FBC, se observó que estos fueron muy superiores a los FABS, para cada sitio (Tabla 2), indicando que la biodisponibilidad del glifosato está dada mayoritariamente por las moléculas disueltas en el agua superficial más que por las presentes en los sedimentos.

**Tabla 2:** Factores de bioconcentración (FBC) y de acumulación biota-sedimento (FABS) de glifosato en *Ludwigia peploides*.

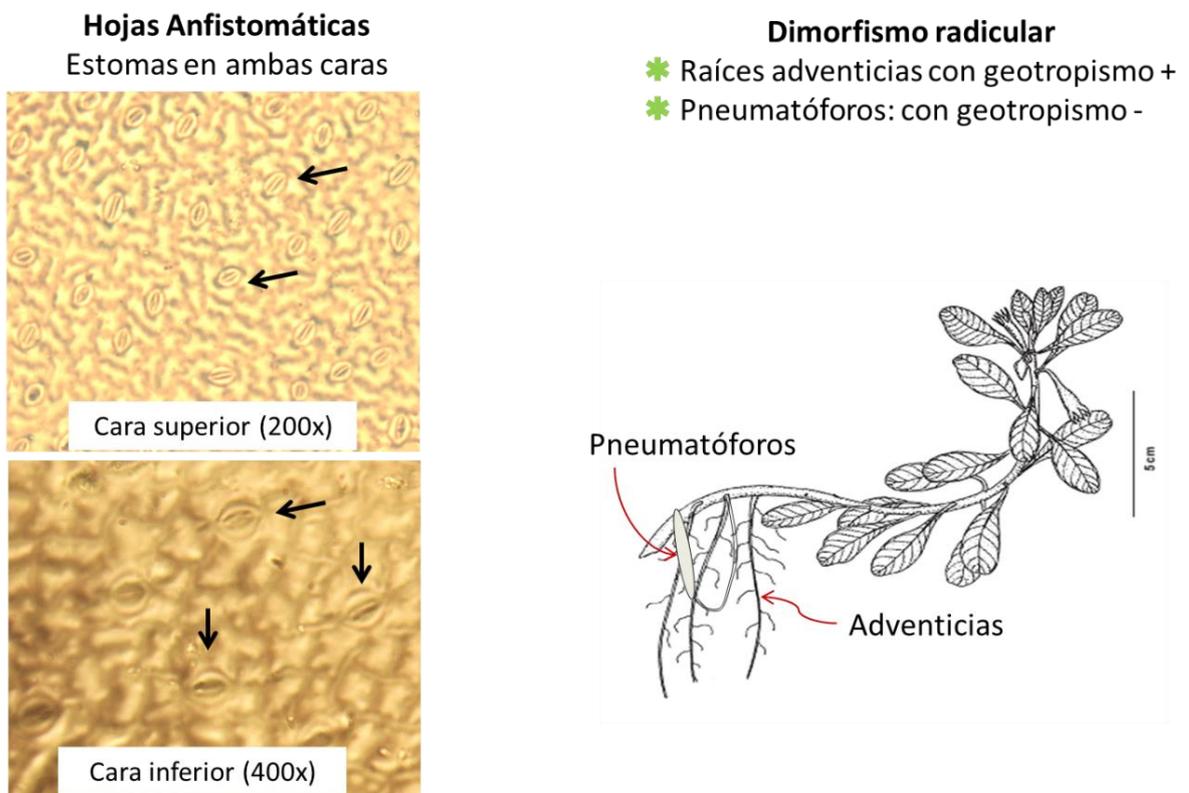
<i>Sitio de muestreo</i>	<i>FBC (L g<sup>-1</sup>)</i>	<i>FABS<sup>a</sup></i>
S1	n.c.	2,5 ± 0,8
S2	n.c.	5,4 ± 0,5
S3	220,0 ± 60	4,4 ± 1,7
S4	120,0 ± 80	2,2 ± 2,1
S5	58,8 ± 4,7	33,3 ± 3,8
S6	20,0 ± 20	0,2 ± 0,3
S7	37,1 ± 8,5	8,7 ± 2,8
S8	68,0 ± 4,0	6,8 ± 0,6

<sup>a</sup>: Sin unidades; n.c.: no calculado

El ingreso de glifosato en *L. peploides* podría ocurrir a través de las hojas flotantes o a través de las raíces flotantes sumergidas. En el primer caso, el ingreso por las hojas puede ocurrir por la difusión de agua principalmente teniendo en cuenta que el glifosato es una molécula altamente hidrofílica. La anatomía de las hojas puede contribuir al ingreso foliar del glifosato debido a que éstas se caracterizan por la ausencia de cutícula y la presencia de estomas en ambas caras de las hojas, hojas anfistomáticas (Bedoya y Madriñán, 2014), que incrementan la superficie de intercambio con el agua (Figura 7).

Por otro lado, la presencia de pneumatóforos en las raíces flotantes sumergidas (Figura 7) también podría facilitar el ingreso del herbicida a la

planta, debido a que los mismos están involucrados en el intercambio de sustancias e iones disueltos en agua (Ellmore, 1981; Bedoya y Madriñán, 2014). Los FABSs bajos obtenidos para el glifosato en *L. peploides* podrían ser explicados por la fuerte absorción de las moléculas a la fracción de materia orgánica de los sedimentos (datos no presentados). En este sentido, la biodisponibilidad del glifosato desde los sedimentos a las raíces arraigadas al sedimento sería baja.



**Figura 7:** Características anatómicas de las hojas y raíces de *Ludwigia peploides*. Microfotografías tomadas por la autora. Flecha: células oclusivas. Diagrama del cuerpo vegetal modificado de Cumana Campo (2010).

Hasta el momento, la degradación metabólica del glifosato en las plantas está descrita por diversos mecanismos (Duke y Powles, 2008). González-Torralva *et al.*, (2012) compararon el metabolismo en dos biotipos de *Conyza canadensis*, uno resistente y uno no susceptible. Los autores encontraron que en el primero, se produce la desaparición completa de glifosato por conversión a glioxilato, sarcosina y AMPA dentro de las primeras 96 h después del tratamiento. Sin embargo, en el biotipo susceptible, solamente se encontró glioxilato. Otros estudios han descrito la detección de residuos de AMPA en plantas tolerantes a glifosato (Cruz- Hipolito *et al.*, 2011; Rojano- Delgado *et al.*, 2012). Sin embargo, no hay información disponible acerca de la biotransformación de glifosato en plantas silvestres susceptibles. Por lo tanto, la ausencia de AMPA en las hojas de *L. peploides* podría deberse a que ésta hidrófita no es capaz de metabolizar el glifosato por la vía del AMPA.

## **Reflexión final**

La capacidad de *L. peploides* para acumular contaminantes ha sido previamente informada para plaguicidas organoclorados, indicando junto con nuestros resultados, de acumulación del herbicida glifosato, la importancia de esta especie como un organismo biomonitor para evaluar los niveles de plaguicidas en los cuerpos de agua dulce superficiales. Asimismo, debido a su amplia distribución en las Américas, esta hidrófita puede ser propuesta para programas de biomonitoreo a gran escala.

## **Agradecimientos**

Este trabajo se realizó con el financiamiento otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2014-1460 otorgado a la Dra. Débora J. Pérez; PICT 2014-1462 otorgado al Dr. José Luis Costa).

## Referencias

- Agilent Technologies. 2016. Agilent Products for Solid Phase Extraction Brochure. [www.chem.agilent.com](http://www.chem.agilent.com). Consulta en línea 17 Diciembre de 2016.
- Alvarez DA, Huckins JN, Petty JD, Jones-Lepp T, Stuer-Lauridsen F, Getting DT, Goddard JP, Gravell A. 2008. Chapter 8: Tool for monitoring hydrophilic contaminants in water: polar organic chemical integrative sampler (POCIS). In Greenwood R, Mills G, Vrana B, eds, *Comprehensive Anal Chem* 48:171-197.
- Aparicio VC, De Gerónimo E, Marino D, Primost J, Carriquiriborde P, Costa JL. 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93:1866-73.
- Arts G, Davies J, Dobbs M, Ebke P, Hanson M, Hommen U, Knauer K, Loutseti S, Maltby L, Mohr S, Poovey A, Poulsen V. 2010. AMEG: the new SETAC advisory group on aquatic macrophyte ecotoxicology. *Environ Sci Pollut Res.* 17:820–823.
- Bedoya AM, Madriñán S. 2014. Evolution of the aquatic habit in *Ludwigia* (Onagraceae): morpho-anatomical adaptive strategies in the Neotropics. *Aquat Bot* 120: 352–362.
- Bou Manobens J, Font Garcia J. 2016. Situació de *Ludwigia peploides* (Onagraceae) a Catalunya. *Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural*, 80, pp.57–58.
- Boutin C, Strandberg B, Carpenter D, Mathiassen SM, Thomas PJ. 2014. Herbicide impact on non-target plant reproduction: What are the toxicological and ecological implications?. *Environ Poll* 185: 295-306.
- Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. <http://www.casafe.org/publicaciones/guia-de-productos-fitosanitarios/>. Consulta en línea 20 de Octubre de 2012.
- Carvahlo RF, Bromilow RH, Greenwood R. 2007. Uptake and translocation of non-ionised pesticides in the emergent aquatic plant parrot feather *Myriophyllum aquaticum*. *Pest Manag Sci* 63:798–802.
- Cedergreen N. 2008. Herbicides can stimulate plant growth. *Weed Research* 48:429–438.
- Cedergren N, Streibig JC, Kudsk P, Mathiassen SK, Duke SO. 2007. The occurrence of hormesis in plants and algae. *Dose-response* 5: 150-162.
- Connell DW. 2005. Pesticides, in Connell DW, ed, *Basic Concepts of Environmental Chemistry* 2nd ed, Taylor and Francis CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 167-189.

- Cruz-Hipolito H, Rojano-Delgado A, Domínguez-Valenzuela JA, Heredia A, Luque de Castro MD, De Prado R. 2011. Glyphosate tolerance by *Clitoria ternatea* and *Neonotonia wightii* plants involves differential absorption and translocation of the herbicide. *Plant Soil* 347: 221–230.
- Cumana Campos LJ. 2010. Clave para especies de *Ludwigia* L. (Onagraceae) de la Región Nor-Oriental e Insular de Venezuela depositadas en el herbario IRBB. *Acta Bot Venez* 33:299-327.
- Dandelot S, Verlaque R, Dutartre A, Cazaubon A. 2005. Ecological, dynamic and taxonomic problems due to *Ludwigia* (Onagraceae) in France. *Hydrobiologia* 551: 1–6.
- Discover Life. <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Ludwigia+peplodes>. Consulta en línea: 27 de Abril de 2017.
- Duke SO, Powles SB. 2008. Mini- Review glyphosate: a once- in- a- century herbicide. *Pest Manag Sci.* 64: 319- 325.
- Ellmore G. 1981. Root dimorphism in *Ludwigia peploides* (Onagraceae): structure and gas content of mature roots. *Amer J Bot* 68: 557-568.
- Freemark K, Boutin C. 1994. Nontarget-plant risk assessment for pesticide registration. *Environ Manag* 18:841–854.
- Gonzalez M, Miglioranza KSB, Grondona S, Silva Barni MF, Martinez DE, Peña A. Organic pollutant levels in an agricultural watershed: The importance of analyzing multiple matrices for assessing streamwater pollution. *Environ Sci Processes Impact* 15: 739-750.
- González-Torralva F, Rojano-Delgado AM, Luque de Castro MD, Mülleder N, De Prado R. 2012. Two non-target mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes. *J Plant Physiol* 169: 1673–1679.
- Gosciny S, Unterluggauer H, Aldrin J, Hanot V, Masselter S. 2012. Determination of glyphosate and its metabolite AMPA (aminomethylphosphonic acid) in cereals after derivatization by isotope dilution and UPLC-MS/MS. *Food Anal Methods*, 5:1177-1185.
- Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Scoccianti C, Mattock H, Straif K. 2015. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol* 16:490-491.
- Hernández F, Hidalgo C, Sancho JV. 2000 Determination of glyphosate residues in plants by precolumn derivatization and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *J of AOAC International* 83: 728-734.

- Himel CM. 1974. Analytical methodology in ULV. In: Pesticide application by ULV Methods. British Crop Protection Council Monograph. 11: 112–119.
- Hock P, Barber J, Diazgranados M. 2011. Phylogeny and biogeography of *Ludwigia* (Onagraceae).  
<http://2011.botanyconference.org/engine/search/index.php?func=detail&aid=345>.  
 Consulta en línea 14 de Septiembre de 2016.
- Ibañez M, Pozo OJ, sancho JV, López FJL, Hernández F. 2005. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry J. *Chromatogr A*. 1081:145-155.
- Koskinen WC, Marek L, Hall KE. 2016. Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water, plant materials and soil. *Pest Manag Sci* 72: 423–432.
- Lahitte HB, Hurrell JA. 1997. Plantas de la Costa. Literature of Latin America. Colin Sharp, Buenos Aires, Argentina.
- Lewis MA. 1995. Algae and vascular plants tests, in Rand, G.M. (Ed). Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment, second ed. Taylor and Francis, Washington, D.C., 135-169 pp.
- Menone ML, Pérez DJ, Lukaszewicz G, Camadro EL. 2015. Identificación de hidrófitas dulceacuícolas para estudios de genotoxicidad de contaminantes acuáticos. *J. Basic Appl. Genetics*. 26:5-13.
- Myers JP, Antoniou MN, Blumberg B, Carroll L, Colborn T, Everett LG, Hansen M, Landrigan PJ, Lanphear BP, Mesnage R, Vandenberg LN, vom Saal JS, Welshons WV, Benbrook CM. 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ Health* 17:15-19.
- Okada E, Costa JL, Bedmar F. 2016. Adsorption and mobility of glyphosate in different soils under no-till and conventional tillage. *Geoderma* 263:78–85.
- Perez DJ, Menone ML, Doucette WJ. 2013. Root-to-shoot transfer and distribution of endosulfan in the wetland macrophyte *Bidens laevis* L. *Environ Toxicol Chem* 32: 2478–2481.
- Perez DJ, Okada E, De Gerónimo E, Aparicio VC, Menone ML, Costa JL. 2016. Dynamics of current-use pesticides in the agricultural model basin. VI Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC, Capítulo Argentino). Córdoba 11-14 de 2016. Argentina.

- Rojano-Delgado AM, Cruz-Hipolito H, De Prado R, Luque de Castro MD, Rodríguez Franco A. Limited uptake, translocation and enhanced metabolic degradation contribute to glyphosate tolerance in *Mucuna pruriens* var. utilis plants. *Phytochemistry* 2012; 73:34–41.
- Ronco AE, Marino DJ, Abelando M, Almada P, Apartin CD. 2016. Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environ Monit Assess* 188:458.
- Siembra, Cosecha, Producción y Rendimiento. Ministerio de Agroindustria. Presidencia de la Nación. [http://www.siiia.gob.ar/\\_apps/siis/estimaciones/estoma2.php](http://www.siiia.gob.ar/_apps/siis/estimaciones/estoma2.php). Consulta en línea Septiembre de 2016.
- Turgut C. 2005. Uptake and modelling of pesticides by roots and shoots of parrotfeather (*Myriophyllum aquaticum*). *Environ Sci Pollut Res* 12:342-346.
- Wood M. 2006. Squelching water primrose. *Agricultural Research Magazine* 54(5): 13.
- Zhang W, Jiang F, Ou J. 2011. Global pesticide consumption and pollution: with 800 China as a focus. *Proc Int Acad Ecol Envir Sci* 1: 125-144.

## Acerca de los autores

Dra. DÉBORA JESABEL PÉREZ

Dra. ELENA OKADA

Dra. VIRGINIA CAROLINA APARICIO

Dr. JOSÉ LUIS COSTA

Laboratorio de Pesticidas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Balcarce, Argentina.

Dra. MIRTA LUJÁN MENONE

Laboratorio de Ecotoxicología, Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (IIMYC – CONICET), Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP), Mar del Plata, Argentina.

## Acerca del primer autor

Débora Jesabel Pérez es Doctora en Ciencias Agrarias, egresada de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNMDP. Actualmente se desempeña como Investigadora Asistente del CONICET. Recibió el premio SETAC / Procter & Gamble Company Fellowship for Doctoral Research in Environmental Science” por su proyecto doctoral sobre “Potencial de *Bidens laevis* L., macrófita común de ambientes lagunares, como biomonitor de efectos genotóxicos del insecticida endosulfán”. Ha desempeñado cargos docentes en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UNMDP y actualmente trabaja abocada al biomonitoreo y evaluación de efectos subletales de plaguicidas de uso actual en cuencas agrícolas.

